

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Fisiología



**ALTERACIONES ESTRUCTURALES Y MECÁNICAS
VASCULARES ASOCIADAS A LA PROGRAMACIÓN
FETAL DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL**

TESIS DOCTORAL

Perla Yareli Gutiérrez Arzapalo

2016

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Fisiología de la Universidad Autónoma de Madrid. Financiada por el Ministerio de Economía y Competitividad en su convocatoria del Plan Nacional (FEM2012-37634-C03-01) y (FEM2015-63631-R).

Dedicatorias

A toda mi familia

Especialmente a mi Sofía

Agradecimientos

A través de estas líneas quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que con su apoyo científico y humano han colaborado en la realización de este trabajo de investigación.

Muy especialmente a mis directores de tesis, los doctores Silvia y Ángel Luis por aceptarme en su grupo de investigación, por su todo su apoyo recibido durante estos 5 años, por su paciencia, dedicación, por confiar en mí y por sus valiosos consejos para la realización de este trabajo. Ha sido un privilegio poder contar con su ayuda.

Gracias a la Dra. Maricarmen, por sus grandes aportaciones a esta tesis, por sus orientaciones, su motivación, por haber tenido siempre la paciencia y disposición necesaria para ayudarme.

Agradezco al Dr. Regadera por su inestimable ayuda que ha sido de mucha importancia para mí. Por transmitirme el interés y motivaciones para realizar la estancia predoctoral en el extranjero, así como todas sus aportaciones científicas en mi trabajo durante todos estos años.

Gracias a Charo por su gran ayuda en los análisis estadísticos

Gracias a la Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS), institución en la que estudié mi carrera profesional, por otorgarme e incorporarme al programa de becas de doctores Jóvenes. A mis profesores que tanto aprecio; Profesora Cuquis, José Romero, Profesor Cristobal Chaidez, José Luis Meza, Francisco Robles; siempre me han apoyado en todo lo que he necesitado.

Gracias al respaldo institucional del Dr. Jesús Israel Martínez Félix, Director Gral. del Centro de Investigación y Docencia en Ciencias de la Salud (CIDOCS) de la UAS y a todo personal académico que labora en esta institución.

Gracias al Dr. Michael Schnoor, por su aceptación en su laboratorio de Biomedicina Molecular en el CINVESTAV, gracias a ello pude realizar la estancia en la cual aprendí técnicas nuevas y a trabajar con otros investigadores.

Gracias al Dr. Dautt, a la Enf. Marina Rosas y al personal de neonatología por aceptarme en el Hospital de la Mujer en el cual aprendí muchísimo ya que ellos

me transmitieron sus conocimientos sobre los protocolos utilizados en los hospital.

Gracias a todas aquellas personas que me ayudaron en la etapa de laboratorio: En Madrid: a Pilar, David (salvador de todos nuestros problemas, eres único), Cynthia, César, José Luís, hemos llegado a ser muy buenos amigos y se quedan muy marcados en mi corazón, gracias por todos esos momentos tan buenos que pasamos dentro y fuera del laboratorio. También por ayudarme siempre cuando los necesité en los experimentos y darme muchos ánimos en mis momentos de desesperación. A Luis por su gran ayuda en los cálculos de mecánica. A Begoña, Laia, Ana, Marta Gil, Beatriz, Marisol, Helena, a todos.

En México D.F., a Sandra, Karla, Hilda, Alex, Ismael, Alí, Alfonso, Eduardo, Diana, aunque fue poco tiempo, suficiente para conocerlos y aprender mucho de ellos, muy buena experiencia obtenida durante esta estancia.

A todos los compañeros que vienen solo por un tiempo, pero muy importantes: Carolina (Brasil), Karen, Karem, Paulina (Chile), Parichat, Tam (Tailandia) y muchos más que es imposible poner a todos.

A todas esas personas que están “detrás de cámaras”, siempre dispuestas a ayudarnos en todo lo que haga falta, muchas gracias por su disposición siempre que la necesité: A Toño del departamento de informática, a Lola y Ana de laboratorio de microscopía confocal, a David, Carmen y a todo el personal del animalario de la facultad. A José María del CNIC por su enorme ayuda.

Gracias a todos mis amigos, Mónica y fam., Nacho, Ángeles, Elvira, Jesús. A los que las distancia nos separa pero el cariño nos une; Melina, Génesis, Juan Carlos, Brenda, Raquel, Pahola, Lizeth, Daniela, Jazmín... Marco Noé, Alfredo, Adrián, Javier, Cristina, Silvita, Paola, Cielo, Martita, y muchos más... siempre me apoyaron desde mi Sinaloa y me daban ánimos para seguir adelante.

A toda mi familia, mis padres Rosalba y Valentín, mis hermanos Alfredo, Karina, Ana Laura; a mis sobrinos y cuñados, a Paúl por su inmenso apoyo y paciencia en todo momento, a Sofía por los interminables días con su madre ausente y aun así se quejó poco, al resto de la familia tíos, primos, abuelas, a mi tío Fide que me intercedió siempre para los trámites de la beca.

GRACIAS...

Índice

	Página
Abreviaturas	
Resumen	5
Abstract	8
Introducción	10
1. Enfermedades cardiovasculares	11
1.1. Factores de riesgo cardiovascular	13
1.1.1. <i>Factores de riesgo no modificables</i>	14
1.1.2. <i>Factores de riesgo modificables</i>	15
2. Hipertensión arterial	17
2.1. Mecanismos responsables	18
2.1.1. <i>Factores funcionales</i>	18
2.1.2. <i>Factores estructurales</i>	20
3. Estructura de la pared arterial	20
3.1. Organización	21
3.2. Componentes celulares	22
3.3. Matriz extracelular	23
3.3.1. <i>Componentes mayoritarios</i>	24
3.3.2. <i>Síntesis y degradación</i>	26
4. Propiedades mecánicas de la pared vascular	27
4.1. Adaptaciones de la pared vascular al flujo pulsátil del corazón	27
4.2. Fuerzas que soporta la pared arterial	28
4.3. Cuantificación de las propiedades elásticas	29
5. Remodelado vascular	31
5.1. Tipos de remodelado	32
6. Programación fetal de la hipertensión	33
6.1. Alteraciones orgánicas asociadas	35
6.2. Mecanismos implicados	36
6.3 Dimorfismo sexual en la programación fetal de la hipertensión	37
7. Modelos experimentales de programación fetal	38
Hipótesis y Objetivos	40
Hypothesis & Objectives	43
Material y Métodos	45
1. Animales de experimentación	46
1.1. Modelo experimental de programación fetal	46

2. Organización de los experimentos	47
3. Protocolos	49
3.1. Medida de parámetros hemodinámicos	49
3.1.1 <i>Medida de la presión arterial y la frecuencia cardíaca en la rata anestesiada</i>	49
3.1.2. <i>Medida de la Presión Arterial mediante pletismografía</i>	49
3.2. Medida de la retracción elástica de la aorta	50
3.3. Estudio de las propiedades mecánicas de la aorta en segmentos aislados	51
3.4. Determinación de la estructura de la aorta mediante microscopía confocal	54
3.4.1. <i>Procesamiento de la muestra</i>	54
3.4.2. <i>Visualización y cuantificación de la luz vascular y grosor de la túnica media</i>	55
3.4.3. <i>Visualización y cuantificación de las células de la túnica adventicia</i>	55
3.4.4. <i>Visualización y cuantificación del colágeno</i>	56
3.4.5. <i>Visualización y cuantificación de la lámina elástica interna</i>	57
3.5. Purificación de la elastina de la aorta	59
3.5.1. <i>Purificación de aorta para la cuantificación de la elastina y colágeno por Dot Blot</i>	59
3.5.2. <i>Purificación de la elastina para el estudio de sus propiedades mecánicas</i>	62
3.5.3. <i>Estudio de la mecánica vascular de la elastina purificada de aorta</i>	62
3.6. Estudio de la estructura y mecánica de la arteria mesentérica de resistencia	62
3.6.1. <i>Miografía de presión</i>	62
3.6.2. <i>Estudio mediante microscopía confocal</i>	64
4. Análisis estadístico	64
Resultados	66
1. Parámetros de crecimiento corporal	67
1.1. Ratas gestantes	67
1.2. Crías	67
1.2.1. <i>Peso corporal</i>	67
1.2.2. <i>Longitud de la tibia</i>	69
2. Parámetros hemodinámicos	70
2.1. Presión arterial y frecuencia cardíaca en el animal anestesiado	70
2.2. Presión arterial en el animal despierto	71
3. Estudios en la arteria aorta	72
3.1. Estructura	72
3.2. Propiedades mecánicas	78
3.2.1. <i>Retracción elástica a los 21 días y a los 6 meses de edad</i>	78
3.2.2. <i>Curvas tensión-deformación en segmentos de aorta intacta</i>	79
3.3. Elastina	81
3.3.1. <i>Organización de la elastina en la lámina elástica interna de la aorta</i>	81
3.3.2. <i>Purificación de la elastina</i>	83
3.3.3. <i>Contenido de elastina en la aorta</i>	85
3.3.4. <i>Curvas tensión-deformación de la elastina purificada</i>	86
3.4. Colágeno	88
3.4.1. <i>Contenido en colágeno de la aorta</i>	88
3.4.2. <i>Visualización del colágeno en la aorta</i>	89

3.4.3. Cuantificación del colágeno de la adventicia	92
4. Estudios en arteria mesentérica de resistencia	93
4.1. Estructura	93
4.2. Propiedades mecánicas	95
4.3. Organización de la elastina	97
Discusión	98
1. Validación de la metodología utilizada	99
1.1. Purificación de elastina y determinación de su pureza	99
1.2. Cuantificación del colágeno y su organización	100
2. Modelo de programación fetal de la hipertensión	103
3. Alteraciones vasculares de la programación fetal de HTA	104
3.1. Alteraciones de la aorta	105
3.2. Alteraciones de las arterias de resistencia	112
Conclusiones	115
Conclusions	118
Bibliografía	120

Índice de Figuras

	Página
Figura 1. Principales factores de riesgo cardiovascular	14
Figura 2. Valores de presión arterial que delimitan los diferentes estadios de hipertensión	17
Figura 3. Estructura de la pared arterial	21
Figura 4. Estructura molecular de la elastina y el colágeno	25
Figura 5. Tensiones que soporta la pared arterial	28
Figura 6. Curva tensión-deformación en una arteria	30
Figura 7. Tipos de remodelado vascular	33
Figura 8. Programación fetal de la enfermedad cardiovascular	34
Figura 9. Modelo experimental de programación fetal	47
Figura 10. Esquema representativo de los procedimientos experimentales realizados a distintas edades	48
Figura 11. Medida de la presión arterial en la rata anestesiada y ejemplo de representativo del registro	49
Figura 12. Medida de la presión arterial sistólica mediante pletismografía	50
Figura 13. Medida de la retracción elástica de la aorta	51
Figura 14. Estudio de la relación tensión-deformación en aorta segmentos de torácica	53
Figura 15. Protocolo de tinción, montaje y adquisición de imágenes en microscopia confocal	54
Figura 16. Ejemplos representativos para el análisis de la estructura de la aorta mediante microscopía confocal	56
Figura 17. Medida de la cantidad relativa de elastina y colágeno mediante imágenes binarias	58
Figura 18. Método de extracción simultánea de elastina y colágeno vascular	60
Figura 19. Sistema de miografía de presión y ejemplo de arteria mesentérica presurizada	63
Figura 20. Peso de las crías al nacimiento, a los 21 días y 6 a los meses de edad	68
Figura 21. Longitud de la tibia de ratas C y R de 21 días y 6 meses de edad	69
Figura 22. Presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) en ratas C y R de 21 días y 6 meses de edad	71
Figura 23. Presión arterial sistólica de ratas de 18 meses de edad	72
Figura 24. Diámetro interno y diámetro externo de la aorta de ratas de 21 días y 6 meses de edad	73
Figura 25. Grosor y área de la sección de corte de la media de la aorta de ratas C y R de 21 días y 6 meses de edad	75
Figura 26. Grosor, número de células y densidad de la capa adventicia de la aorta de ratas C y R de 21 días y 6 meses de edad	77
Figura 27. Grosor media/diámetro interno y grosor pared/diámetro	78

Figura 28. Retracción elástica de la aorta en ratas C y R de 21 días y 6 meses de edad	79
Figura 29. Curva tensión-deformación y parámetro β en aorta de ratas C y R de 21 días y 6 meses de edad	80
Figura 30. Área relativa ocupada por la elastina de la lámina elástica interna arteria aorta	82
Figura 31. Ejemplo representativo del efecto de distintos tiempos de incubación en 0.1 N NaOH en aorta de rata de 21 días de edad	84
Figura 32. Peso relativo de elastina de aorta de ratas de 21 días y 6 meses de edad	85
Figura 33. Relación tensión-deformación en segmentos de elastina purificada de aorta de ratas de 21 días y 6 meses de edad	87
Figura 34. Contenido relativo de colágeno en la aorta de ratas C y R de 21 días y 6 meses de edad	88
Figura 35. Imágenes representativas de la distribución del colágeno y la elastina en un anillo de aorta de ratas control de 6 meses de edad	89
Figura 36. Fibras de colágeno en la adventicia de aorta de rata visualizadas mediante segunda armónica y modo reflexión	90
Figura 37. Imágenes representativas de las fibras de colágeno a distintas profundidades de la túnica adventicia	91
Figura 38. Área relativa ocupada por el colágeno en la región externa de la adventicia de aorta	92
Figura 39. Diámetros interno y externo de la arteria mesentérica de resistencia de ratas R y C de 6 meses de edad	93
Figura 40. Grosor, número de células y densidad celular de la tunicas media y adventicia de la arteria mesentérica de resistencia de ratas R y C de 6 meses de edad	95
Figura 41. Relación tensión-deformación de segmentos de arteria mesentérica de resistencia de ratas de 6 meses de edad	96
Figura 42. Organización de la lámina elástica interna de arteria mesentérica de resistencia de ratas de 6 meses de edad	97
Figura 43. Resumen alteraciones estructurales en la aorta	106

Índice de Tablas

	Página
Tabla 1. Frecuencia cardiaca en ratas C y R de 21 días y 6 meses de edad	70
Tabla 2. Valores del área de la sección de corte de la arteria mesentérica de resistencia sometida a 80mm Hg en ratas C y R de 6 meses de edad	94

Abreviaturas

Angiotensina II

ACV: Accidente cerebrovascular

AMR: Arteria mesentérica de resistencia

ANOVA: Análisis de varianza

BRAs: bloqueadores del receptor de angiotensina

C: Control

CI: Cardiopatía isquémica

CE: Células endoteliales

C-HDL: Colesterol transportado por las lipoproteínas de alta densidad

C-LDL: Colesterol transportado por las lipoproteínas de baja densidad

CML: Células musculares lisas

DM: Diabetes mellitus

DM 2: Diabetes mellitus tipo 2

EC: Enfermedad coronaria

ECV: Enfermedad cardiovascular

EDHF factor polarizante derivado de endotelio

ESC: Sociedad Europea de Cardiología

HDL-c: Lipoproteínas de alta densidad/High density lipoprotein

HDL: Lipoproteína de alta densidad

HTA: Hipertensión arterial

IAM: Infarto agudo de miocardio

IECA: inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina

IMC: Índice de masa corporal

KH: Krebs Heinsel

LDL Lipoproteína de baja densidad

MEC: matriz extracelular

MMP: metaloproteasa

Abreviaturas

NADPH: Dinucleótido fosfato reducido de nicotinamida y adenina

NO: Óxido nítrico

NFD: Nefropatía diabética

OMS: Organización mundial de la salud

PA: Presión arterial

PAD: Presión arterial diastólica

PAS: Presión arterial sistólica

PFA: Paraformaldehído

R: Restringida

RD: Retinopatía diabética

SD: Sprague Dawley

SNS: Sistema nervioso simpático

SRA: Sistema Renina Angiotensina

TA: Tensión arterial

TG: Triglicéridos

TIMP: inhibidores de metaloproteasas

Resumen

Abstract

Resumen

Las etapas fetal y perinatal son periodos críticos del desarrollo que pueden programar al individuo para el desarrollo posterior de enfermedades cardiovasculares y sus factores de riesgo. Estudios epidemiológicos demuestran que el estrés fetal, en particular un déficit de nutrientes, “programa” para el desarrollo de hipertensión en la edad adulta. Estudios en modelos animales demuestran que la programación fetal de la hipertensión presenta dimorfismo sexual afectando más a los machos. Entre las alteraciones responsables se han sugerido anomalías en el desarrollo vascular y, en particular, de la proteína elastina, cuyo periodo de síntesis es la etapa fetal y las primeras etapas de la vida posnatal. **Hipótesis.** La desnutrición fetal altera la estructura vascular y sus propiedades mecánicas, pudiendo existir diferencias entre sexos que justifiquen el dimorfismo sexual en el desarrollo de hipertensión. **Objetivo.** Evaluar, en un modelo de programación fetal en rata, si se producen alteraciones sexo-dependientes en: 1) la estructura de las arterias de conducción y de resistencia, 2) las propiedades mecánicas vasculares, 3) la cantidad o la organización del colágeno y la elastina en la pared vascular y 4) la evolución de la presión arterial desde el destete al envejecimiento. Para la consecución de estos objetivos ha sido necesaria la validación de nueva metodología, en concreto de métodos de purificación de elastina vascular y de visualización y cuantificación de colágeno fibrilar. **Resultados.** La desnutrición fetal induce en la aorta de ratas jóvenes, machos y hembras: 1) remodelado hacia el exterior hipertrófico, 2) mayor elasticidad, 3) alteraciones en la organización de la elastina en la lámina elástica interna, sin cambios cuantitativos, asociado a una mayor elasticidad de la elastina purificada y 4) contenido normal de colágeno. En la edad adulta, la aorta de ratas macho presenta: 1) remodelado hacia el exterior hipertrófico, 2) menor elasticidad, 3) mayor cantidad relativa de elastina en la lámina elástica interna, sin cambios en las propiedades mecánicas de la elastina purificada y 4) mayor contenido en colágeno total y fibrilar de la adventicia. En cambio, en las hembras se observa: 1) remodelado hacia el exterior hipertrófico, con mayor tamaño de la luz vascular, 2) elasticidad normal, 3) menor cantidad relativa de elastina en la lámina elástica interna y mayor elasticidad de la elastina purificada y 4) mayor

contenido en colágeno total, sin cambios en el contenido de colágeno fibrilar de la adventicia. En las arterias de resistencia se producen alteraciones similares en machos y hembras: 1) remodelado hacia el interior eutrófico, 2) menor elasticidad y 3) menor tamaño de las fenestras de la lámina elastina interna. En cuanto a la evolución de la presión arterial, los machos desarrollan hipertensión a los 6 meses de edad, que se mantiene a los 18 meses de edad, mientras que las hembras permanecen normotensas a ambas edades. Los resultados relacionados con la validación de la metodología utilizada indican que: 1) para la purificación de elastina de aorta se requieren 30min de incubación en NaOH para ratas de 21 días y 45 min para ratas de 6 meses de edad y 2) las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal en modo reflexión son similares a las obtenidas mediante segunda armónica. **Conclusiones.** En relación a los aspectos metodológicos: 1) Se ha optimizado un protocolo para la obtención simultánea de colágeno y elastina de la aorta, que permite la cuantificación de ambas proteínas y la realización de estudios funcionales con la elastina purificada y 2) Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal en modo reflexión permiten la visualización y cuantificación del colágeno fibrilar. En cuanto a la implicación de las alteraciones estructurales y mecánicas en la programación fetal de la hipertensión: 1) las diferencias en las alteraciones estructurales y mecánicas de la aorta entre machos y hembras pueden contribuir al dimorfismo sexual en el desarrollo de hipertensión y 2) La presencia de alteraciones estructurales y mecánicas en las arterias de resistencia similares en ambos sexos sugiere que las hembras, probablemente, cuentan con alguna adaptación funcional que evita el aumento de la resistencia vascular periférica, contribuyendo a su protección frente al desarrollo de hipertensión.

Abstract

Fetal and perinatal stages are critical growth periods that may program for later development cardiovascular diseases and its risk factors. Epidemiological studies show that fetal stress, specially nutrient deficiency, “program” the development of hypertension in adult age. Studies in animal models demonstrate that fetal programming of hypertension exhibits a sexual dimorphism, being males the most affected. Among the possible alterations, a deficient vascular development, and in particular elastin synthesis, has been suggested, since elastogenesis is restricted to fetal and early postnatal life. **Hypothesis.** Fetal undernutrition alters the vascular structure y and its mechanical properties, with possible sex-dependent pattern which might explain sexual dimorphism in the development of hypertension. **Objectives.** To evaluate, in a rat model of fetal programming, if there are sex-dependent alterations in: 1) the structure of conduit and resistance arteries, 2) vascular mechanical properties, 3) content or organization of collagen and elastin in the vascular wall y 4) blood pressure evolution from weaning to old age. To achieve these objectives it has been necessary to validate new methodology, in particular, methods to purify vascular elastin and to visualize and quantify fibrillar collagen. **Results.** Fetal undernutrition induces in the aorta from young male and female rats: 1) hypertrophic outward remodeling, 2) higher elasticity, 3) alteration in elastin organization in the internal elastic lamina, without quantitative changes, associated to a larger elasticity of the purified elastin and 4) normal collagen content. In adult age the aorta from male rats exhibited: 1) hypertrophic outward remodeling, 2) lower elasticity, 3) larger elastin relative content in internal elastic lamina, without changes in elasticity of purified elastin and 4) larger total and adventitial fibrillar collagen content. Instead, in females we found: 1) hypertrophic outward remodeling, with larger vascular lumen size, 2) normal elasticity, 3) lower elastin relative content in the internal elastic lamina and higher elasticity of purified elastin and 4) larger total collagen content without change in adventitial fibrillar collagen. In the resistance arteries males and females exhibited similar alterations: 1) inward eutrophic remodeling, 2) lower elasticity and 3) smaller fenestrae size in the internal elastic lamina. Regarding blood pressure evolution, it was found that males develop hypertension at the age of 6 months, which is maintained at the age of 18 months, while female remain normotensive at both age points. The results related to methodology validation indicate: 1) aortic elastin purification requires 30 minutes of NaOH incubation for 21-day old rats and 45 minutes for 6 month-old rats y 2) the images obtained by confocal microscopy in reflection mode are similar to those obtained by second harmonic generation. **Conclusions.** In relation to the methodology aspects: 1) we have optimized a protocol to obtain simultaneously aortic collagen and

elastin, which allows quantification of both proteins and functional studies with purified elastin and 2) the images obtained by confocal microscopy in reflection mode allow the visualization and quantification of the fibrillar collagen. Regarding the implication of vascular structural and mechanical alterations in fetal programming of hypertension: 1) the differences in the structural and mechanical alterations of the aorta between males and females may contribute to sexual dimorphism in hypertension development and 2) the presence of similar structural and mechanical alterations in resistance vessels in both sexes suggest that females, probably, have functional adaptations that circumvent the increase of the peripheral vascular resistance, contributing to their protection against hypertension development.

Introducción

1. Enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares (ECV), junto con el cáncer, las enfermedades respiratorias crónicas y la diabetes, son algunas de las enfermedades más importantes dentro de las enfermedades no transmisibles. Las enfermedades no transmisibles o crónicas son aquellas que tienen una larga duración, una progresión generalmente lenta y no se transmiten de persona a persona.

Las ECV integran a un conjunto de patologías que afectan al sistema circulatorio con diversas etiologías.

Las ECV pueden ser clasificadas en: aquellas que afectan a la circulación de la sangre -como la aterosclerosis y trombosis-, las que afectan a la estructura y función de los vasos sanguíneos y las que afectan al tejido cardíaco (World Health Organization 2009).

La aterosclerosis es un proceso obstructivo de los vasos sanguíneos, en el que se produce acumulación de lípidos en la pared vascular, formándose una placa de ateroma que reduce la luz vascular (Libby 2002). En algunas situaciones la placa se vuelve inestable, desprendiéndose, lo que produce un émbolo que circula hasta que llega a obstruir vasos sanguíneos de pequeño calibre, impidiendo el flujo. Además, el flujo de sangre puede verse reducido por fenómenos trombóticos, en los que interviene una coagulación anómala de la sangre (Libby 2002).

Por otro lado, el flujo sanguíneo también puede verse comprometido por alteraciones estructurales de la pared vascular, como los fenómenos de remodelado vascular, que pueden conducir a una reducción del calibre del vaso. También existen alteraciones funcionales de los vasos sanguíneos que llevan a un exceso de contracción, reduciendo también el calibre vascular; entre estas alteraciones cabe destacar la disfunción endotelial (Gimbrone, Garcia-Cardena 2016).

Tanto si la disminución del flujo sanguíneo se produce por fenómenos ateroscleróticos, alteraciones de la coagulación o anomalías de la pared vascular, la reducción del aporte de sangre lleva como consecuencia la falta de nutrientes y oxígeno lo que, en órganos vitales como el corazón y el cerebro puede llevar a la muerte celular, con graves consecuencias. Así, alteraciones

en las arterias coronarias pueden producir cardiopatía coronaria, que puede conducir a una angina de pecho o a un infarto de miocardio, si la falta de flujo se mantiene durante un tiempo elevado (Libby 2002). Si el territorio vascular afectado son las arterias cerebrales, se produce un ictus (accidente cerebrovascular transitorio) y, si el tiempo de falta de riego sanguíneo es elevado, puede conducir a un infarto cerebral (Safar et al. 2014). También puede producirse una rotura de las arterias cerebrales por la presencia de una alteración estructural, como puede ser un aneurisma (Safar et al. 2014); la salida de sangre al parénquima cerebral produce compresión del tejido y los vasos circundantes, lo que conduce a reducir su flujo y también puede llevar a la isquemia o a la muerte celular. En conjunto, todas las alteraciones que reducen el flujo sanguíneo cerebral, se denominan accidentes cerebrovasculares.

Otro conjunto de ECV son las que afectan al tejido cardíaco; entre ellas cabe destacar las cardiopatías reumáticas las cardiopatías congénitas y la insuficiencia cardíaca (Friedman, Child 1998, Miró Meda et al. 2012).

Por último, también se consideran dentro de las ECV las vasculopatías periféricas, que están relacionadas con alteraciones de la estructura de los vasos sanguíneos que irrigan las extremidades inferiores, como la insuficiencia venosa crónica (Fernandez Valenzuela et al. 1988).

1.1. Factores de riesgo cardiovascular

Las ECV son responsables de la mayoría de las muertes producidas por enfermedades no transmisibles. En el año 2012, las ECV fueron responsables de unos 17 millones de muertes, lo que representa un 31% del total de muertes registradas en el mundo; de ellas, 7,4 millones se debieron a cardiopatía coronaria y 6,7 millones a accidentes cerebrovasculares (World Health Organization 2009).

El desarrollo de una ECV está ligado a la presencia de diversos factores de riesgo. Un factor de riesgo es cualquier característica o exposición de un individuo, que aumente su probabilidad de sufrir una enfermedad o lesión. Los factores de riesgo cardiovascular son características personales y hábitos de vida que se relacionan de manera independiente con la probabilidad de desarrollar ECV. Existen dos tipos de factores de riesgo: los no modificables,

como la edad, el sexo y la genética, y los factores modificables, que pueden ser prevenidos o controlados con tratamiento médico o modificando los hábitos higiénico-dietéticos.

En la Figura 1 (Sarnak et al. 2003), se enumeran los principales factores de riesgo cardiovascular, describiéndose a continuación algunos de los más importantes.

Figura 1. Principales factores de riesgo cardiovascular

Factores no modificables	Factores modificables
Edad	Hipertensión
Sexo	Dislipemia (CT; HDL-C; LDL-C; TG)
Raza	Tabaquismo
Genética	Obesidad abdominal (Perímetro cintura)
Historia familiar de ECV prematura (Varones < 55 años y Mujeres < 65 años)	Diabetes Mellitus
Episodios CV previos	Sedentarismo
Episodios Cerebrovasculares previos	

Adaptado de Sarnak, et al, 2003

1.1.1. Factores de riesgo no modificables

Edad: El riesgo cardiovascular aumenta con la edad, habiéndose demostrado que, aproximadamente, 4 de cada 5 muertes debidas a ECV se producen en personas mayores de 65 años. Esto se debe al deterioro del sistema cardiovascular a lo largo de la vida, que conlleva a alteraciones en la función y estructura del corazón y de los vasos sanguíneos, resultando en una disminución de la eficiencia del corazón para bombear la sangre, un aumento de la rigidez vascular (McEniery et al. 2007), así como un progresivo deterioro de la función endotelial y progresión de los procesos ateroscleróticos (Pereira et al. 2010, Celermajer et al. 1994).

Sexo: Numerosos estudios demuestran que los hombres tienen mayor riesgo de padecer ECV que las mujeres en edad fértil, aunque el riesgo es similar a partir de la menopausia. Este hecho se ha relacionado con el papel protector de los estrógenos sobre el sistema cardiovascular (Yamatani et al. 2015). No obstante, además de las hormonas sexuales, pueden existir otros factores

relacionados con el sexo que también influyan sobre el desarrollo de ECV. Así, a pesar de que la enfermedad aterosclerótica aparece de forma más tardía en las mujeres (Pereira et al. 2010), se ha constatado que las mujeres evolucionan peor a partir de la menopausia (Llacer, Fernández-Cuenca 2003, Dormandy, Murray 1991).

Factores genéticos: Se ha demostrado que individuos cuyos familiares directos, padres o hermanos, presentaron un problema cardiovascular antes de los 55 años de edad tienen un mayor riesgo cardiovascular. La mayor susceptibilidad genética de padecer una enfermedad cardiovascular puede estar relacionada con genes concretos que afecten al perfil lipídico, factores de la coagulación o resistencia a la insulina. La aparición de enfermedad vascular precoz en los progenitores suele ser un marcador de afectación temprana en la siguiente generación (Laschkolnig et al. 2014, Pedro-Botet et al. 1993). Además, factores de riesgo no modificables, tales como la hipertensión, la diabetes y la obesidad, también pueden transmitirse de generación en generación (Puzyrev 2015).

1.1.2. Factores de riesgo modificables

Dislipemia: La alteración de la concentración plasmática de colesterol o triglicéridos es considerada como uno de los principales factores de riesgo de ECV. Ha sido demostrado que la elevación del colesterol total en individuos sanos (la concentración normal de colesterol en plasma, es de 120-200 mg/dL) se asocia con un aumento de eventos cardiovasculares adversos (Chan et al. 2008). Además del colesterol total hay que tener en cuenta los valores de colesterol sérico unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL, Low Density Lipoprotein); y de alta densidad (HDL, High Density Lipoprotein), cuyos valores normales en sangre son inferiores a 120 mg/dL para las LDL y superiores a 60 mg/dL para las HDL.

La incidencia de hipercolesterolemia en la población es muy alta (afecta a más de la mitad de la población), aunque un elevado porcentaje lo desconoce ya que existe un control escaso de los niveles de colesterol sérico. Hay que destacar que la dieta y la actividad física pueden ayudar a normalizar los niveles de colesterol o la relación LDL/HDL, reduciendo la necesidad de utilización de fármacos (Guallar-Castillón et al. 2012).

Diabetes mellitus (DM): Los pacientes con diabetes tipo 2 presentan niveles elevados de glucosa en sangre (mayor a 110 mg/dL) y resistencia a la insulina (Sowers et al. 2001). Es bien conocido que los pacientes con Diabetes tipo 2 tienen el doble de riesgo de desarrollar enfermedad coronaria e ictus, aumentando de 2 a 4 veces la mortalidad por dichas enfermedades (Gu et al. 1998). También está incrementado el riesgo de infarto agudo de miocardio y de algunas complicaciones como la retinopatía y la nefropatía diabéticas (Lövestam-Adrian et al. 1998, Salvotelli et al. 2015). En España, la prevalencia de diabetes está alrededor del 12% de la población (Medrano et al. 2005, Banegas et al. 2006).

Sobrepeso y obesidad: El sobrepeso y la obesidad constituyen una epidemia mundial y se consideran uno de los factores de riesgo cardiovascular más importantes (Liao et al. 1999). Un individuo tiene sobrepeso cuando su índice de masa corporal (IMC) está entre 25-29.9 kg/m² y se considera obesidad cuando el IMC supera los 30kg/m². Además de ser un factor de riesgo *per se*, la obesidad también influye sobre otros factores de riesgo como la hipertensión (Landsberg 2001), la dislipemia y la prevalencia de Diabetes Mellitus y la resistencia a la insulina (Navarro et al. 2007, Virtanen et al. 2005).

Hábitos y estilos de vida: Numerosos estudios demuestran que la ECV está asociada con hábitos dietéticos y estilos de vida inadecuados, entre los que cabe destacar el tabaquismo, el consumo excesivo de sal y alcohol y dietas inadecuadas. El tabaco es un poderoso factor que potencia otros factores de riesgo cardiovascular. Por ejemplo, acelera la aterosclerosis y el daño vascular producido por la hipertensión arterial, incrementa los niveles de colesterol sérico, la obesidad y agrava la resistencia a la insulina (Alenta et al. 2003, Stripping 1997). Por otro lado, la ingesta de alcohol puede producir una elevación aguda de la tensión arterial, pudiendo provocar elevación persistente de la misma (Hemmelgarn et al. 2004). Así mismo, una elevada ingesta de sal también repercute en la presión arterial, que es otro de los factores de riesgo de ECV más importantes. La inactividad física también es considerada un factor de riesgo de enfermedad cardiovascular, pudiendo además incrementar otros factores de riesgo como la diabetes, la obesidad y las dislipemias (World Health Organization 2002, Tremblay et al. 2010).

Hipertensión arterial (HTA): La HTA es uno de los factores de riesgo de ECV más claramente establecidos. Debido a que esta Tesis Doctoral está centrada en el estudio de la hipertensión, este factor de riesgo se describe más ampliamente en el apartado siguiente.

2. Hipertensión arterial

La HTA es una elevación sostenida de la presión arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) o de ambas, que afecta a una parte muy importante de la población adulta, especialmente a los de mayor edad (De la Sierra et al. 2008). Los valores normales de presión arterial en adultos son 120/80 mmHg, considerándose hipertensión valores de presión arterial superiores a 140/90 mmH (Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension, European Society of Cardiology 2007). Debido a que la HTA es un importante factor de riesgo cardiovascular, estos valores son revisados periódicamente por la Sociedad Europea de Hipertensión y la Sociedad Europea de Cardiología y sus equivalentes en EE UU). No obstante, cada una de estas sociedades hace una clasificación ligeramente distinta, que se resumen en la Figura 2.

Figura 2. Valores de presión arterial que delimitan los diferentes estadios de hipertensión

Tabla 1: Clasificación de la Hipertensión Arterial Asociación Norteamericana del Corazón: JNC VII			
Nivel de Presión Arterial (mmHg)			
Categoría	Sistólica		Diastólica
Normal	< 120	y	< 80
Prehipertensión	120-139	o	80-89
Hipertensión Arterial			
Hipertensión Estadio 1	140-159	o	90-99
Hipertensión Estadio 2	≥ 160	o	≥ 100

Tabla 2: Clasificación de la Hipertensión Arterial Sociedad Europea de Hipertensión y Cardiología			
Nivel de Presión Arterial (mmHg)			
Categoría	Sistólica		Diastólica
Óptima	< 120	y	< 80
Normal	120-129	y/o	80-84
Normal Alta	130-139	y/o	85-89
Hipertensión Arterial			
Hipertensión Estadio 1	140-159	y/o	90-99
Hipertensión Estadio 2	160-179	y/o	100-109
Hipertensión Estadio 2	≥ 180	y/o	≥ 100
Hipertensión Sistólica aislada	≥ 140	y	< 90

Modificada de European Heart Journal, 2007

2.1. Mecanismos responsables

Existen numerosos sistemas implicados en la regulación de la presión arterial, incluyendo los sistemas vascular, renal, nervioso y hormonal y, una alteración en cualquiera de ellos, puede contribuir al desarrollo de hipertensión.

Desde el punto de vista de su origen, la hipertensión arterial puede clasificarse en hipertensión primaria o esencial e hipertensión secundaria. La hipertensión secundaria (que supone un 5-10% de HTA) tiene un origen específico conocido, siendo las causas más frecuentes la enfermedad renovascular, la coartación aórtica, el hiperaldosteronismo de diversas causas o el uso de algunos fármacos. La HTA esencial es de origen desconocido y multifactorial, interviniendo tanto factores genéticos como estilos de vida, etc. (Kuschnir, Mendonça 2007, Timberlake et al. 2001). La hipertensión esencial es la más frecuente en la población, representando el 90-95% de los casos de HTA.

La determinación de los mecanismos responsables de la elevación de la presión arterial resulta bastante complicado dada la estrecha relación entre la presión arterial y los numerosos sistemas fisiológicos implicados en su regulación.

A continuación se detallan los factores tanto funcionales como estructurales, que han sido descritos en la literatura como implicados en el proceso hipertensivo.

2.1.1. Factores funcionales

Sistema nervioso simpático (SNS): Un incremento en la actividad del SNS eleva la presión sanguínea y contribuye al desarrollo y mantenimiento de la hipertensión a través de la estimulación de la actividad cardíaca, de la vasculatura periférica y de los riñones, causando un incremento del gasto cardíaco, de la resistencia vascular y de la retención de líquidos (Mark 1996, DiBona, Kopp 1995). Los mecanismos responsables del incremento de la actividad simpática son complejos e involucran alteraciones en baro y quimiorreceptores. Los barorreceptores arteriales son reajustados a un nivel más alto en los pacientes hipertensos, principalmente por la Angiotensina II, los radicales libres y la endotelina (Chapleau et al. 1988).

Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona: La Angiotensina II (AII), producida por el sistema renina-angiotensina es una hormona fundamental en la

regulación de la presión arterial, que tiene múltiples dianas, incluyendo el músculo liso vascular, el sistema renal y el sistema nervioso. Entre sus efectos están la vasoconstricción periférica, la retención de líquidos -a través de la liberación de aldosterona- y el aumento de la liberación de noradrenalina de las terminaciones simpáticas. Todos estos mecanismos contribuyen a la elevación de la presión arterial (Epstein 2001). La importancia de la AI ha sido constatada en numerosos estudios con fármacos inhibidores del sistema renina angiotensina, los cuales han demostrado tener una relevante acción antihipertensiva (Oparil et al. 2003).

Disfunción Endotelial: La disfunción endotelial se define como una serie de alteraciones que afectan a la síntesis, liberación, difusión o degradación de los factores generados por el endotelio, los cuales tienen numerosas funciones fisiológicas como la inhibición de la coagulación, de la adhesión plaquetaria, la reducción de la proliferación celular y el mantenimiento del tono vascular (Michiels 2003).

Existen diversas alteraciones que se pueden incluir en lo que se denomina disfunción endotelial. En primer lugar, la disfunción endotelial puede estar asociada a una menor liberación de factores vasodilatadores derivados del endotelio, incluyendo el óxido nítrico (NO), la prostaciclina y el factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF). Por otro lado, en algunas situaciones patológicas también se ha constatado una mayor producción de radicales libres de oxígeno, que reducen la biodisponibilidad de NO. Además, la disfunción endotelial puede estar asociada a una mayor liberación de sustancias vasoconstrictoras derivadas del endotelio como la endotelina 1. Todas estas alteraciones son responsables, en última instancia, de un aumento del tono vascular, que contribuye al desarrollo de hipertensión (Esteller Pérez 2005).

Mecanismos Renales: El riñón es un órgano fundamental en la regulación de la presión arterial, a través del mantenimiento del equilibrio hidroelectrolítico. Por tanto, cualquier alteración que produzca una modificación en la retención de sodio y agua por el riñón conduce a una expansión del volumen plasmático y, en consecuencia a una elevación de la presión arterial. Entre los mecanismos implicados en la hipertensión de origen renal se ha sugerido una disminución

en el número de nefronas o una inhibición de los transportadores de sodio en el túbulo renal (Mackenzie et al. 1996, Brenner et al. 1988).

2.1.2. Factores estructurales

Las alteraciones estructurales de la pared vascular también pueden contribuir de manera importante al desarrollo de hipertensión, a través de modificaciones en la rigidez/elasticidad de la pared vascular y/o a consecuencia de la disminución de la luz vascular.

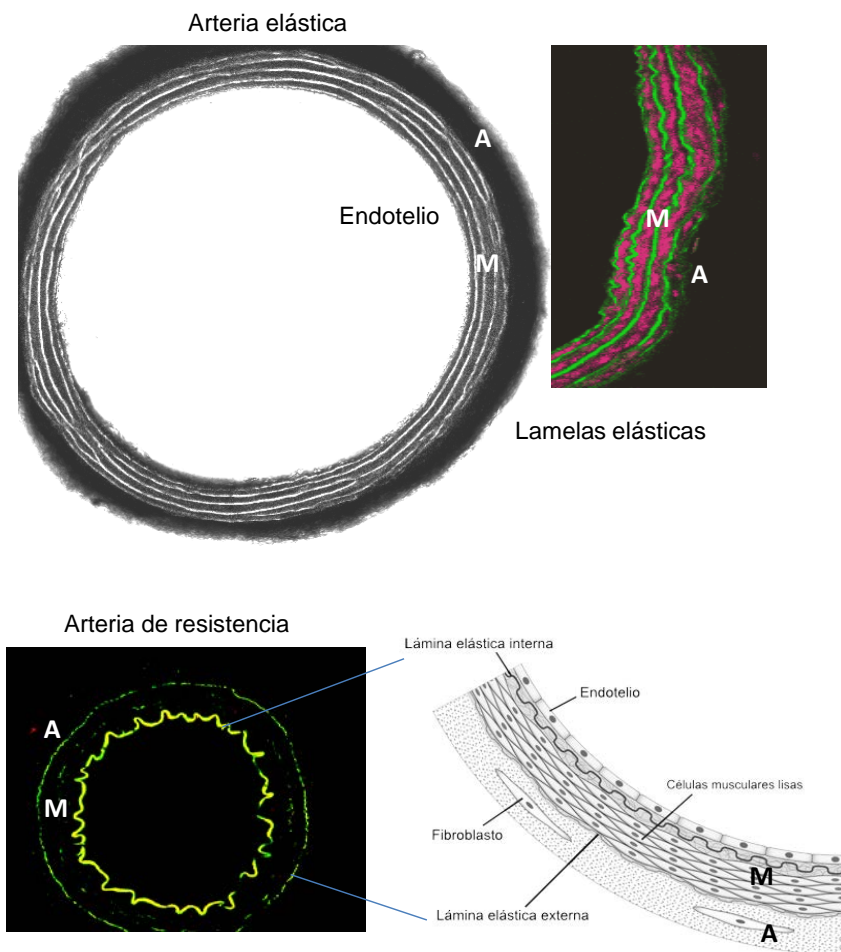
Ya que el presente trabajo estudia la relación entre desarrollo de hipertensión y alteraciones en la pared vascular, a continuación se detallan los aspectos relativos a los componentes estructurales de la pared arterial y su organización.

3. Estructura de la pared arterial

La pared vascular es un órgano activo, formado por componentes celulares, células endoteliales, células musculares lisas y fibroblastos y componentes no celulares, la matriz extracelular. Estos componentes pueden modificar su proporción relativa aumentando, disminuyendo o reorganizándose, en respuesta a estímulos fisiológicos y patológicos (Touyz, Schiffrin 2000).

La pared arterial se estructura en tres capas o tunicas: íntima, media y adventicia, cuyo grosor y composición varían en los distintos tramos del lecho vascular. En la Figura 3 se muestra un esquema de la organización de la pared arterial en arterias elásticas y de resistencia.

Figura 3. Estructura de la pared arterial



A, indica la túnica adventicia; M, indica la túnica media.
Modificado de Arribas et al, 2006

3.1. Organización

Túnica íntima o interna. Está localizada en la parte más interna de la pared vascular. Está compuesta por una monocapa de células endoteliales situadas sobre una membrana basal y una capa subendotelial. El endotelio está constituido por células epiteliales y la lámina basal microfibrilar está formada por colágeno tipo IV, elastina, fibronectina, laminina y proteoglicanos (Sumpio et al. 2002). La capa subendotelial está compuesta por tejido conjuntivo y, en ocasiones, están presentes células de músculo liso.

Separando la túnica íntima de la túnica media se encuentra la lámina elástica interna, compuesta por fibras elásticas que forman una estructura fenestrada (Wagenseil, Mecham 2009). A través de estas fenestras, las células endoteliales pueden hacer contacto con las células musculares lisas de la

túnica media, lo que se conoce como uniones mioendoteliales (Carlson et al. 1982).

Túnica muscular o media. Está formada por células musculares lisas (CML) organizadas de forma concéntrica o helicoidal y tejido conectivo, mayoritariamente fibras elásticas. Las CML tienen como función principal la constricción y dilatación en respuesta a diversos estímulos, regulando así el flujo sanguíneo.

Las fibras elásticas están organizadas en láminas fenestradas entre las que se sitúan las CML, así como fibras de colágeno y otros elementos de la matriz extracelular, mayoritariamente proteoglicanos, que constituyen la denominada unidad lamelar (Wolinsky, Glagov 1967). El número de unidades lamelares varía en función del tramo vascular, siendo máximo en las grandes arterias, a la salida del corazón y va disminuyendo progresivamente hasta las arterias de resistencia, en las que sólo existe una lámina elástica (Rhodin 1980).

Túnica adventicia o externa. Es la capa más externa del vaso y, en las grandes arterias, está separada de la capa media por la lámina elástica externa, la cual forma una red de fibras elásticas en arterias de menor tamaño (Arribas et al. 2008). Está formada por una matriz extracelular rica en colágeno, que es sintetizada por una población heterogénea de miofibroblastos (Wagenseil, Mecham 2009). Dependiendo de tipo de arteria, la adventicia se encuentra en diferentes porcentajes en relación con el grosor total de la pared. Los vasos de pared más gruesa presentan una adventicia con pequeños vasos (*vasa vasorum*) que tienen ramas penetrantes, que llegan hacia la mitad de la capa media para irrigarla, no alcanzando la íntima. Los vasos de pared más delgada obtienen el oxígeno por difusión desde la luz vascular. Por otro lado, la adventicia de los vasos musculares y de resistencia alberga las terminaciones nerviosas simpáticas, por lo que la adventicia, no sólo tiene un papel mecánico, sino que también participa de forma directa en la modulación de la función vascular (Gonzalez et al. 2001).

3.2. Componentes celulares

Células endoteliales. Forman una monocapa de células epiteliales, con un espesor entre 0,2-0,4 micras, que tapiza la cara interna de la pared vascular. Esta capa controla la comunicación entre la sangre y los vasos, ejerciendo un

papel dual como sensor y transmisor de señales. Las células endoteliales son capaces de detectar cambios tanto de tipo físico -relacionados con el estrés mecánico producido por el flujo y la presión de la sangre- como de tipo químico -debidos a la liberación de sustancias por parte de las células sanguíneas o de los tejidos-. Su capacidad de adaptarse funcionalmente a estos estímulos le confiere un papel clave en la regulación de la homeostasis vascular a la cual contribuye mediante la liberación de múltiples sustancias activas. Cuando se produce un desequilibrio en la biodisponibilidad de dichas sustancias pueden resultar alteradas la coagulación, la contracción y la permeabilidad vascular y pueden inducir fenómenos inflamatorios. Todo ello se conoce como disfunción endotelial (Drexler 1997).

Células musculares lisas. Son el principal componente de la túnica media. Están constituidas por microfilamentos de actina asociados con miosina, en estructuras sumamente ordenadas.

Durante el desarrollo fetal, las CML participan en la síntesis de la MEC, junto con las células endoteliales y los fibroblastos. En condiciones normales, tras completar el desarrollo, las CML tienen fenotipo contráctil, realizando la contracción a través de numerosos receptores de neurotransmisores, factores locales y hormonas, regulando así el flujo sanguíneo. Sin embargo, bajo determinados estímulos, como pueden ser cambios en la presión intravascular, acúmulo de lípidos en la pared o hipoxia, las CML pueden transformarse en células de fenotipo sintético proliferativo, con una gran capacidad de síntesis de MEC (Wagenseil, Mecham 2009).

Fibroblastos. Son las células mayoritarias de la adventicia, que permiten la sujeción entre las células y la matriz extracelular. En condiciones normales, el fibroblasto es responsable de la síntesis de la MEC, tanto fibrosa como no fibrosa. Ante determinadas señales químicas o mecánicas, los fibroblastos son capaces de modificar el grado de producción de los distintos elementos de la matriz, lo que contribuye a los procesos de remodelado de la pared vascular (Wagenseil, Mecham 2009).

3.3. Matriz extracelular

La MEC tiene diversas funciones; una puramente estructural, como soporte de células de la pared vascular; otra relacionada con las propiedades mecánicas

de la pared, es responsable de la elasticidad y la resistencia al estiramiento y, una tercera función como reguladora de la biodisponibilidad de factores de crecimiento.

3.3.1. Componentes mayoritarios

Colágeno. Es el elemento estructural básico más importante de todos los tejidos conectivos y también se encuentra en el tejido intersticial de prácticamente todos los órganos, donde contribuye a su estabilidad, mantenimiento de la integridad estructural y resistencia mecánica (Gelse et al. 2003). La unidad fibrilar del colágeno es una triple espiral de cadenas α de tres polipéptidos. Las cadenas α presentan enlaces entrecruzados que son el principal factor que favorece la resistencia mecánica del colágeno. Se conocen unas 14 clases distintas de colágeno. Los tipos I, II y III son los colágenos intersticiales o fibrilares, que son los más abundantes. Los tipos IV, V y VI son formas no fibrilares y se encuentran en el tejido intersticial y en la membrana basal.

El colágeno es una proteína muy rígida por lo que, su papel fisiológico en la pared vascular es el de limitar la distensión del vaso producida por la presión y evitar su rotura cuando la presión es elevada (Jacob 2003). Así, pacientes con deficiencia de colágeno sufren ruptura vascular (Wagenseil, Mecham 2009, Eble, Niland 2009). Por otro lado, un exceso de colágeno es también perjudicial ya que produce un aumento en la rigidez vascular; una deposición excesiva de colágeno en la pared vascular y un aumento de la rigidez es una de las características observadas en la HTA (Ponticos, Smith 2014, Lemarié et al. 2010).

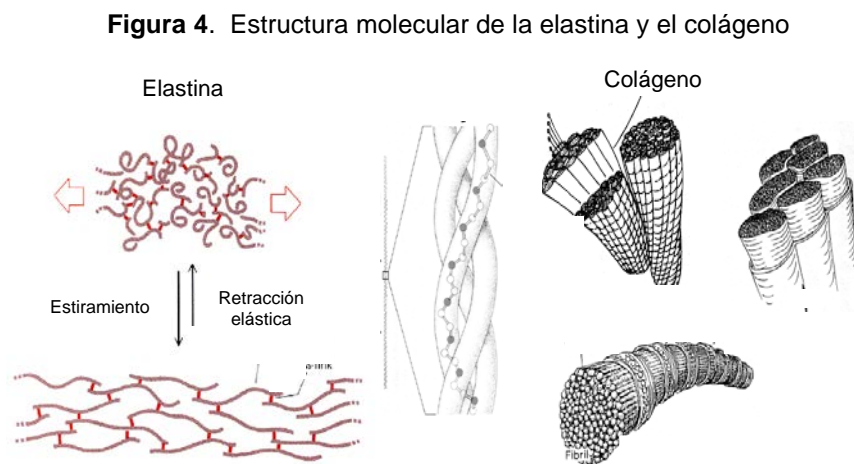
Fibras elásticas. En la pared vascular, las fibras elásticas se encuentran organizadas en lamelas concéntricas, existiendo además fibras aisladas que forman parte de la túnica adventicia. El principal componente de las fibras elásticas es la elastina, que constituye el 90% de las fibras elásticas, y el resto está formado por glicoproteínas microfibrilares como fibrilinas, fibulinas, emilina y MAGPs (Microfibrillar-associated glycoproteins) (Androulakis et al. 2012). El precursor de la elastina es la tropoelastina, una molécula de cadena única, muy hidrofóbica y soluble. La aparición progresiva de uniones cruzadas entre monómeros de tropoelastina produce la elastina madura, que es una molécula

insoluble y con una elevada elasticidad. La síntesis de fibras elásticas o elastogénesis se inicia muy temprano en el desarrollo embrionario y termina en las primeras etapas de la vida (Wagenseil, Mecham 2009). En la edad adulta, sólo hay deposición de nuevas fibras elásticas en respuesta a una elevada tensión de la pared vascular, como en la hipertensión, si bien, estas fibras no tienen la misma funcionalidad que las generadas durante la elastogénesis fisiológica (Arribas et al. 2006).

La función fundamental de las fibras elásticas es dotar al vaso sanguíneo de elasticidad (Rhodin, 1980). Su organización en lamelas permite la distribución de la tensión de una forma homogénea en toda la pared y sobre las fibras de colágeno (Wolinsky, Glagov 1967). El número de lamelas de la pared vascular es directamente proporcional a la tensión que soporta en ese tramo del árbol vascular, siendo máximo en la aorta, en la que la elastina, supone aproximadamente el 50% del peso seco de la arteria (O'Connell et al. 2008).

La elastina es una proteína muy resistente pero puede ser degradada por algunas metaloproteasas (MMPs) y por elastasas, alguna de ellas propia de la pared vascular producida por las CML (Rabinovitch 1999). Aunque las fibras elásticas son muy duraderas, habiéndose estimado su recambio en unos 40 años (Berry, Looker 1973), van fragmentándose a lo largo de la vida, reduciendo su capacidad funcional. Así mismo, dada su elevada afinidad por calcio y lípidos, la acumulación de éstos contribuye a reducir su elasticidad (Robert 2002).

La Figura 4 (Sarnak et al. 2003) muestra un esquema de la organización molecular del colágeno y la elastina.



Adaptado de Averill S., 1989

Matriz extracelular no fibrosa. Está formada por glucoproteínas, proteoglicanos y hialuronanos, sintetizadas por fibroblastos, monocitos y células endoteliales y que constituyen un gel viscoelástico.

Las glicoproteínas son proteínas de adhesión y sirven de unión entre las células y los componentes de la MEC, como el colágeno y los proteoglicanos, por lo que juegan un papel esencial en la estructura y la función de la pared vascular. Entre las glicoproteínas de la pared vascular se encuentran fibronectina, vitronectina, laminina, tenascina y trombospondina (Rozario, DeSimone 2010).

Los proteoglicanos están formados por una proteína central (proteína de unión al cartílago, el agregano, y el versicano) unida a glucosaminoglicanos. Entre los más frecuentes están el heparán sulfato, el condroitín sulfato y el dermatán sulfato. Cumplen diversas funciones relacionadas con la regulación de la estructura y la permeabilidad del tejido conjuntivo. Los proteoglicanos también pueden formar parte de las proteínas de la membrana y ser moduladores del crecimiento y la diferenciación celular. El hialuronano funciona como un ligando de las proteínas centrales y muchas veces sirve de eje o estructura central para los grandes complejos de proteoglicanos. Confiere resistencia elástica y propiedades lubricantes a muchas variedades del tejido conjuntivo.

3.3.2. Síntesis y degradación

Durante el desarrollo embrionario, los componentes de la MEC son sintetizados por los tres tipos celulares de la pared vascular, lo que hace que la proporción de los distintos componentes sea la óptima para llevar a cabo sus funciones. A lo largo de la vida adulta, la pared del vaso está expuesta a múltiples factores que pueden dañarla (deposición de lípidos, hipoxia, secreción de enzimas y producción de radicales libres, así como el aumento de la presión arterial, etc). Como respuesta a estos estímulos, las células de la pared vascular pueden modificar su tasa de síntesis de los distintos componentes de la MEC y de las enzimas que se encargan de su degradación. Estas alteraciones pueden modificar la composición y organización tridimensional de la matriz, y con ello sus funciones (Lemarié et al. 2010, Ponticos, Smith 2014).

La degradación de la MEC se produce fundamentalmente por las metaloproteasas de matriz (MMPs) que son una familia de endopeptidasas,

zinc dependientes. Se clasifican según su estructura, especificidad por el sustrato y unión a membranas en: collagenasas (MMP-1, 8 y 13), estromalinas (MMP-3, 10 y 11), gelatinasas (MMP-2 y 9), metaloproteasas de membrana (MT-MMP) y otras (matrilisina, metaloelastasa, etc.)(Jones, 2003). Las MMPs son sintetizadas por diversos tipos celulares, incluyendo las células endoteliales, las CML y los monocitos. Se sintetizan y secretan como enzimas inactivas, regulándose su actividad por distintos mecanismos y por algunos inhibidores específicos (TIMPs, Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases) (Paramo et al. 2005).

De lo anteriormente descrito, se deduce que la cantidad y composición de la MEC de la pared vascular estará determinada por el equilibrio entre la tasa de síntesis y degradación, determinada esta última por la cantidad y proporción de MMPs y sus inhibidores.

4. Propiedades mecánicas de la pared vascular

Las propiedades mecánicas de la pared arterial son de vital importancia en la regulación de la presión arterial por lo que, su evaluación contribuye al conocimiento de la enfermedad hipertensiva (FISCHER, Cabrera 2004).

4.1. Adaptaciones de la pared vascular al flujo pulsátil del corazón

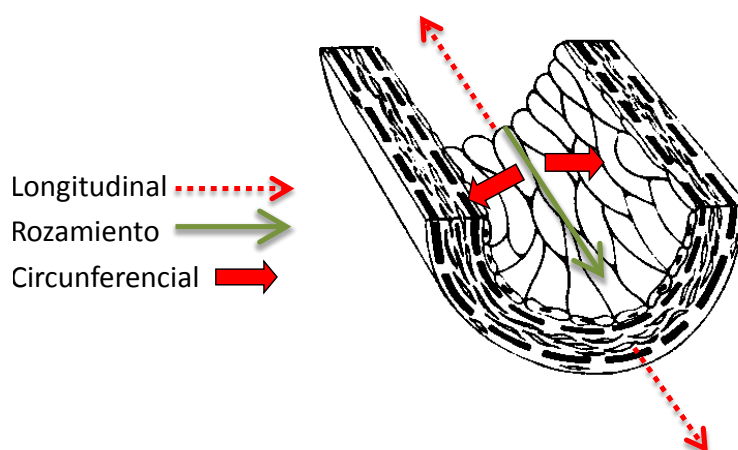
Las arterias elásticas o de conducción están adaptadas para amortiguar las variaciones cíclicas de presión, minimizando el flujo pulsátil del corazón y permitiendo un flujo sanguíneo relativamente constante. Durante la sístole la sangre es impulsada por el ventrículo izquierdo hacia la arteria aorta, proyectándose contra la pared arterial con una gran fuerza. Se ha estimado que, si el tejido de la aorta fuera rígido, la sangre que sale del corazón alcanzaría una velocidad enorme, no sólo en la aorta, sino también en partes más distales del árbol vascular. Esta sangre a gran velocidad iría desgastando las paredes arteriales y también dañaría los elementos formes de la sangre. Sin embargo, el tejido de la aorta y otras grandes arterias posee una gran elasticidad debido a la presencia de las lamelas elásticas que forman parte de la pared. Estas fibras elásticas participan en la regulación de la presión arterial debido a que almacenan temporalmente la energía producida por la contracción del corazón durante la sístole. Durante la diástole, la liberación de esta energía hace que la aorta regresa a su tamaño original propulsando la

sangre contenida. Así, las variaciones de presión en las arterias durante el ciclo cardiaco son de una amplitud relativamente pequeña y distalmente resultan en un flujo continuo (Faury 2001). Este flujo continuo puede verse comprometido si se producen alteraciones en las propiedades elásticas de los vasos de conducción. Además, una pérdida de elasticidad en la aorta puede producir una elevación de la presión de salida, contribuyendo al desarrollo de hipertensión arterial. Esta pérdida de elasticidad también está relacionada con la elevación de la presión arterial durante el envejecimiento, en el que se producen fragmentación y calcificación de la elastina y fibrosis vascular por acúmulo de colágeno (Wang et al. 2010). Por otro lado, a medida que se endurece la pared, se requiere más energía para mantener el gasto cardíaco y se produce un mayor consumo de oxígeno por el miocardio, lo que conlleva a hipertrofia de la pared del miocardio (Milan et al. 2011).

4.2. Fuerzas que soporta la pared arterial

Los vasos sanguíneos están sometidos a tres tipos de tensión (fuerza aplicada por unidad de superficie). La tensión longitudinal, la tensión de rozamiento y la tensión circunferencial sobre la pared, las cuales se esquematizan en la Figura 5 (Wagenseil, Mecham 2009). Estas tensiones inducen deformaciones en los vasos sanguíneos, en sentido radial o longitudinal, que pueden ser cuantificadas experimentalmente.

Figura 5. Tensiones que soporta la pared arterial



La **tensión longitudinal** es la generada por el tejido circundante que rodea los vasos. Cuanto más firmemente unido está un vaso al tejido que lo rodea, mayor es la tensión que soporta este vaso. Por ejemplo, la tensión longitudinal de la

arteria aorta es mayor que la de las arterias que irrigan el mesenterio, ya que tiene un mayor grado de sujeción al tejido circundante. El grado de tensión longitudinal a la que está sometido un vaso provoca una deformación que puede determinarse mediante el estudio de la retracción elástica, es decir, la retracción que experimenta el vaso cuando se le separa del tejido circundante que le mantenía en tensión. Por ejemplo, se ha descrito que la aorta tiene una retracción elástica de, aproximadamente, un 40-60% (Jackson et al. 2002).

La **tensión de rozamiento** es la generada por el flujo de la sangre al deslizarse sobre la superficie endotelial, por lo que esta tensión es directamente proporcional al flujo sanguíneo. En condiciones normales, este rozamiento estimula la liberación de sustancias desde el endotelio, como el NO, que participan en la regulación de la estructura y función vasculares. La tensión de rozamiento no es un parámetro que pueda ser estudiado *in vitro*, pero sí puede cuantificarse *in vivo* mediante dispositivos que se localizan alrededor del vaso de interés (Wagenseil, Mecham 2009).

La **tensión circunferencial** es la generada por la presión de la sangre sobre la pared de los vasos en sentido radial y, por tanto, es directamente proporcional a la presión sanguínea que soporta ese vaso. También es proporcional al diámetro del vaso e inversamente proporcional al grosor de la pared. La tensión circunferencial puede expresarse según:

$$\text{Tensión} = \text{Presión} \times \text{diámetro} / 2 \text{ grosor de la pared}$$

De forma similar a la tensión de rozamiento, el grado de tensión circunferencial también modula la tasa de liberación de factores vasoactivos, así como de crecimiento y muerte de las células de la pared, ya que en dichas células existen receptores que actúan de sensores biomecánicos y transmiten la información de la presión que soporta la pared hacia el interior celular. La respuesta de un vaso sanguíneo a la tensión circunferencial, puede ser determinada *in vitro* en segmentos vasculares aislados. Para ello se analiza la deformación en sentido radial producida por la aplicación de tensión isométrica o presión intravascular.

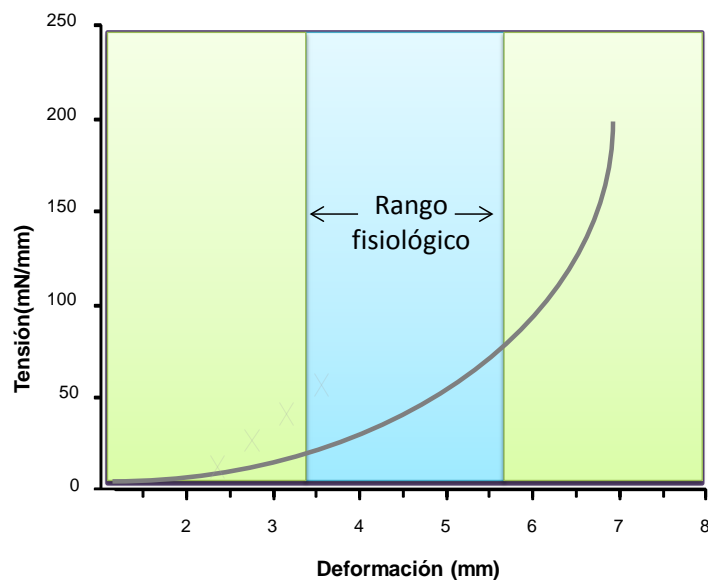
4.3. Cuantificación de las propiedades elásticas

Para determinar las propiedades elásticas intrínsecas de un material, de forma independiente a la geometría, se utiliza como parámetro el Módulo elástico de

Young (E), que es la relación Tensión/Deformación. Para materiales muy rígidos esta relación es alta; es decir, son necesarias tensiones muy elevadas para generar deformación. En cambio, si el material es muy distensible, el módulo elástico de Young es bajo.

Cuando se mide este parámetro en un tejido homogéneo esta relación es lineal. Para materiales no homogéneos, como es el caso de la pared vascular, compuesta de varios elementos (células, colágeno, elastina, etc.), cada uno de ellos con propiedades elásticas diferentes, esta relación no es lineal, ajustándose mejor a una exponencial (Figura 6). En este caso, es más apropiado determinar el módulo elástico incremental (E_{inc}), que corresponde a la pendiente de la curva exponencial tensión/deformación (Dobrin 1978, Ponticos, Smith 2014).

Figura 6. Relación tensión-deformación en una arteria



Adaptado de Wagenseil y Mecham, 2009

Se ha demostrado que, de todos los elementos que componen la pared arterial, la MEC fibrosa -el colágeno y las fibras elásticas- es la que más contribuye a las propiedades elásticas del vaso, a su mecánica pasiva, mientras que el componente celular apenas contribuye (Ponticos, Smith 2014). El colágeno proporciona rigidez y resistencia a la tensión mientras que las fibras elásticas proporcionan resiliencia y elasticidad.

Debido a las distintas propiedades mecánicas de la elastina y del colágeno, las curvas tensión-deformación de una arteria, como se ha indicado anteriormente,

tienen una forma exponencial. A bajas tensiones el vaso es muy deformable, ya que a estas tensiones sólo se deforma la elastina, siendo esta parte de la curva prácticamente lineal y, a medida que aumenta la tensión, el colágeno va reclutándose progresivamente, lo que se refleja en una curva exponencial (Dobrin 1978).

5. Remodelado vascular

El remodelado vascular es un proceso adaptativo de la pared vascular que implica cambios estructurales que afectan al crecimiento, proliferación, migración o muerte celular y a la producción o degradación de la matriz extracelular. Este proceso ocurre en respuesta a estímulos mecánicos, hemodinámicos o humorales, provocando cambios en la geometría, composición y función de la pared vascular. A corto plazo, estos cambios contribuyen al control del flujo sanguíneo en los órganos y tejidos pero, a largo plazo, si el estímulo persiste –por ejemplo una elevación crónica de la presión arterial- resulta en alteraciones patológicas de la pared vascular.

En situaciones de HTA, los cambios en la geometría y la composición de la pared vascular asociados al proceso de remodelado modifican las propiedades funcionales, tanto activas (que dependen de las células) como pasivas (determinadas por la MEC) de los vasos sanguíneos. Estas alteraciones estructurales son de gran relevancia clínica ya que se han asociado con una mayor incidencia de eventos cardiovasculares adversos (Rizzoni et al. 2003, Mathiassen et al. 2007).

Por un lado, estos cambios están provocados por las alteraciones hemodinámicas (de flujo y presión) asociadas al proceso hipertensivo. La tensión de rozamiento originada por el flujo sanguíneo y la tensión circunferencial, debida a la presión arterial, son parámetros que deben mantenerse en un rango de valores relativamente constante ya que si aumentan mucho podrían dañar la estructura de la pared. Para mantener en valores relativamente constantes estas tensiones, los vasos sanguíneos responden a los cambios de flujo y presión alterando su geometría para adaptarse a las nuevas condiciones hemodinámicas (Langille 1991). Por otro lado, durante la hipertensión se producen numerosas alteraciones hormonales, nerviosas y de factores paracrinos, que también juegan un papel en la

modulación de los procesos de daño-reparación de la pared vascular (Lemarié et al. 2010).

El remodelado vascular afecta a todos los tipos de vasos sanguíneos, pero el tipo de alteración difiere en función del tipo de vaso. En términos generales pueden producirse 3 tipos de fenómenos: en las grandes arterias se produce una pérdida de elasticidad, debida a hipertrofia de la pared y a alteraciones en su composición, como consecuencia de la fragmentación y calcificación de las fibras elásticas y a una mayor deposición de colágeno (Lemarié et al. 2010, Heeneman et al. 2007). En las arterias de resistencia se produce estrechamiento de la luz, a veces acompañado de hipertrofia de la pared, por hiperplasia o hipertrofia de las CML, así como por una mayor deposición de colágeno (Mulvany 2002, Intengan, Schiffrin 2000).

5.1. Tipos de remodelado

Atendiendo a criterios geométricos, el remodelado vascular se ha clasificado en hipotrófico, hipertrófico o eutrófico -en función de la masa de la pared- y en remodelado hacia adentro (inward) o hacia afuera (outward), en función de la variación del tamaño de la luz vascular (Mulvany et al. 1996, van Vark et al. 2012, Mulvany 2002).

El **remodelado inward** implica una reorganización de los elementos de la pared o un crecimiento de la misma hacia el interior, lo que da lugar a una disminución del calibre del vaso, pudiendo ser de tipo hipotrófico, eutrófico o hipertrófico. En el caso del **remodelado hacia afuera (outward)**, hay un aumento del calibre del vaso y, de igual manera que el remodelado hacia adentro, puede ser de tipo hipotrófico, eutrófico o hipertrófico.

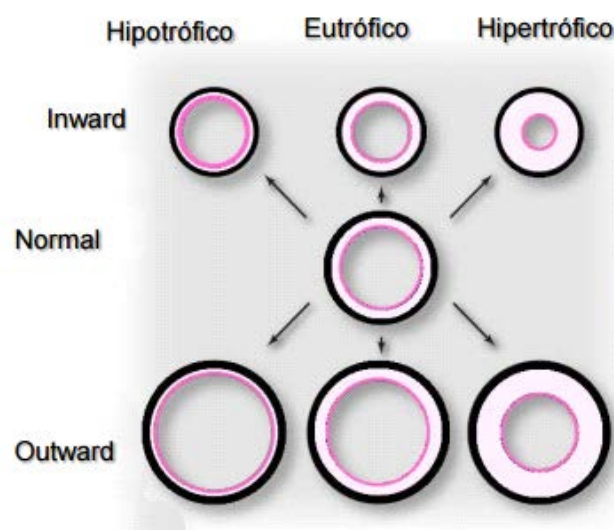
En el **remodelado eutrófico** disminuye la luz vascular sin cambios en la masa de la pared del vaso, como consecuencia de migración y reordenamiento celular. Es característico en pacientes con hipertensión esencial (Rizzoni et al. 2003, Mathiassen et al. 2007), así como en la rata espontáneamente hipertensa (SHR) (Conde et al. 2011). Se ha sugerido que, en este tipo de remodelado participa la Angiotensina II (Intengan, Schiffrin 2000).

En el **remodelado hipertrófico** se produce una disminución del diámetro de la luz asociado a un incremento de la masa vascular por fenómenos de hiperplasia e hipertrofia celular, así como a un aumento de la MEC. Entre los

mecanismos que provocan este tipo de hipertrofia se han sugerido la elevación de la PA y el aumento del tono simpático, así como diversos factores hormonales, entre los que destaca la endotelina-1 (van Varik et al. 2012, Mulvany 2002).

El **remodelado hipotrófico** supone una disminución de la masa de la pared vascular -área de la sección de corte- y se ha asociado con fenómenos de restricción del flujo (Coats et al. 2003). En la Figura 7 se resumen los tipos de remodelado vascular.

Figura 7. Tipos de remodelado vascular



Modificado de Vanik Van, 2012.

6. Programación fetal de la hipertensión

Los mecanismos fisiopatológicos que influyen en el desarrollo de la HTA no están aun totalmente establecidos, conociéndose la influencia de factores genéticos, así como de los hábitos y estilos de vida. Estudios epidemiológicos realizados en los últimos 20 años han demostrado que, además de los factores anteriormente indicados, la etapa fetal también puede contribuir al desarrollo de hipertensión y otros factores de riesgo de ECV en la edad adulta (Cameron, Demerath 2002, McMillen, Robinson 2005, MohanKumar et al. 2007, Nuyt 2008, Poston 2011). Esta hipótesis, inicialmente propuesta por Barker, postula que el bajo peso al nacer inducido por una desnutrición gestacional origina adaptaciones en el feto que predisponen o “programan” para el desarrollo de hipertensión y ECV en etapas posteriores de la vida, proceso llamado “programación fetal” (Barker, Osmond 1986, Barker et al. 1989). Esta hipótesis

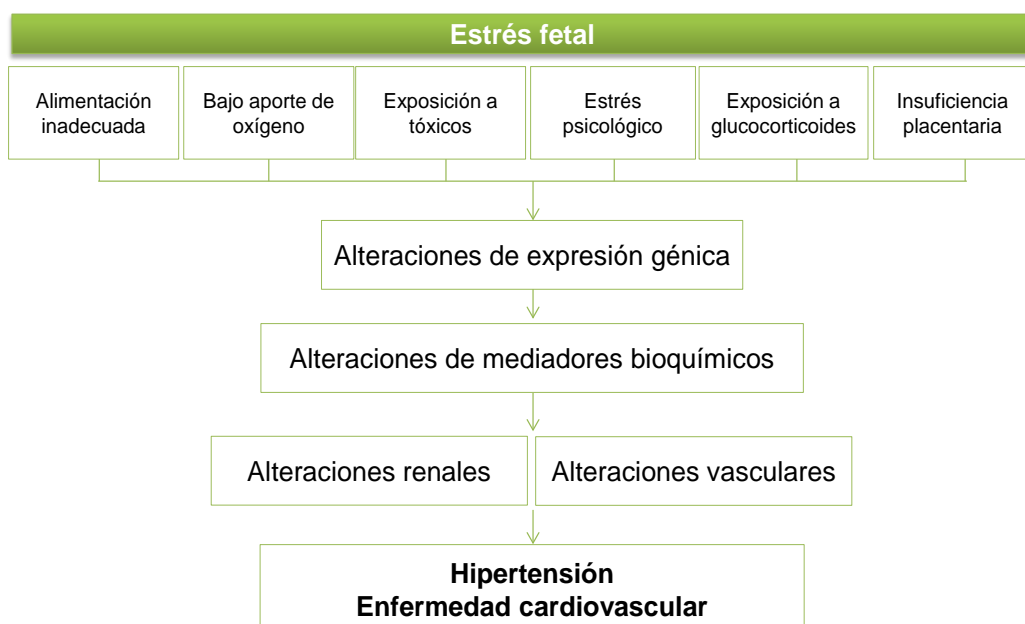
ha sido avalada por numerosos estudios posteriores en la descendencia de poblaciones sometidas a hambrunas durante la etapa gestacional, que han demostrado la asociación entre desnutrición fetal, bajo peso al nacer y desarrollo de hipertensión y ECV en la edad adulta (Roseboom et al. 2000, Painter et al. 2005, Hult et al. 2010).

Esta asociación entre estrés fetal, bajo peso al nacer y desarrollo posterior de ECV está relacionada con la elevada plasticidad del feto y su gran sensibilidad a cambios en el medio ambiente intrauterino. Entre estos factores estresores destacan la falta de nutrientes, bien por inadecuada alimentación de la madre – como sucede en países subdesarrollados o periodos de hambruna- o por una insuficiencia placentaria - frecuente en países desarrollados asociada al retraso en la maternidad- (Poston 2011). Asimismo, existen otras causas de estrés fetal que provocan un inadecuado crecimiento del feto y que correlacionan con una mayor prevalencia de hipertensión en la edad adulta; entre ellos cabe destacar la hipoxia, el estrés materno, la exposición temprana a glucocorticoides o la exposición a tóxicos como la nicotina (Dasinger, Alexander 2016).

Como resultado de la interacción del genoma con un medio intrauterino desfavorable, el feto va generando un conjunto de respuestas que a corto plazo son adaptativas, pero a largo plazo pueden tener consecuencias adversas.

La Figura 8 resume la programación fetal de la enfermedad cardiovascular.

Figura 8. Programación fetal de la enfermedad cardiovascular



6.1. Alteraciones orgánicas asociadas

Se han formulado distintas hipótesis para explicar la relación entre el bajo peso al nacer y el desarrollo de HTA en la edad adulta y, es posible que los mecanismos sean múltiples. Entre otros se han postulado alteraciones en aquellos sistemas relacionados con la regulación de la presión arterial, como son los sistemas renal y vascular.

Alteraciones renales. Brenner y Chertow (Brenner, Chertow 1994), sugieren que el riesgo de desarrollar HTA esencial en la edad adulta aumenta como consecuencia de una alteración en el desarrollo renal que acompaña al retardo intrauterino del crecimiento. Esta hipótesis está avalada por estudios en humanos, que demuestran un menor número de nefronas en individuos con bajo peso al nacer (Manalich et al. 2000, Hughson et al. 2003). Los recién nacidos con bajo peso tendrían menor número de nefronas y, por tanto, menor área de filtración glomerular, lo que favorecería el desarrollo de HTA. Esta hipótesis ha sido también confirmada en modelos de programación fetal, en diversas especies animales (Vehaskari et al. 2001, Gilbert et al. 2005).

Alteraciones vasculares. Existen evidencias que avalan la posibilidad de que un estrés fetal produzca alteraciones en la función vascular o cambios en la estructura de los vasos, que a lo largo de la vida participen en el desarrollo de HTA.

En cuanto a alteraciones que afecten a la función vascular, se ha demostrado en humanos que un estrés fetal se asocia con una disminución de las respuestas endotelio dependiente. Así, la respuesta a la variación del flujo en la arteria braquial está reducida, incluso en edades muy tempranas; es decir, en ausencia de otros factores de riesgo de disfunción endotelial (Leeson et al. 1997). La disfunción endotelial también han sido confirmada en arterias aisladas de diversos modelos animales de programación fetal; por ejemplo, en arterias de resistencia de roedores sometidos a restricción proteica gestacional, está disminuida la respuesta a acetilcolina y aumentada la respuesta vasoconstrictora a endotelina (Brawley et al. 2003). Esta alteración funcional, se ha demostrado que puede ser debida a alteraciones en la producción o eliminación de factores endoteliales, relacionada por ejemplo con un exceso en la producción de radicales libres.

Por otro lado, alteraciones en la estructura y en las propiedades mecánicas vasculares durante la etapa fetal también pueden contribuir al desarrollo de hipertensión en la edad adulta. En concreto, se ha postulado que, en situaciones de crecimiento intrauterino retardado, una alteración en la síntesis de elastina durante la etapa fetal podría conducir a cambios en la mecánica vascular que, a largo plazo, contribuyen al desarrollo de hipertensión (Martyn, Greenwald 2001, Martyn, Greenwald 1997). Aunque no hay evidencia directa de que, en humanos la síntesis de elastina vascular esté disminuida en situaciones de crecimiento intrauterino retardado, se han encontrado alteraciones hemodinámicas en distintos lechos vasculares (AL-GHAZALI et al. 1989). Estas alteraciones hemodinámicas durante un periodo de rápido crecimiento vascular, es plausible que modifiquen la tasa de síntesis de elastina, la cual está muy influida por la presión arterial (Martyn, Greenwald 1997). Esta hipótesis está avalada por la asociación entre un bajo peso al nacer y la rigidez arterial, encontrada en humanos, al realizar medidas de la velocidad de propagación de la onda de pulso (Montgomery et al. 2000, Cheung et al. 2004). Un aumento de la rigidez arterial, también ha sido demostrada en niños prematuros (Irving et al. 2000, Oren et al. 2003). Los mecanismos responsables de dichas alteraciones en la elasticidad arterial, aún no han sido determinados, existiendo muy pocos estudios en animales de experimentación (Khorram et al. 2007).

6.2. Mecanismos implicados

Las alteraciones orgánicas arriba indicadas pueden estar asociadas con cambios en diversos mediadores entre los que destacan el sistema renina angiotensina, los radicales libres de oxígeno y la modulación epigenética de algunos genes, particularmente los relacionados con el IGF-1.

Alteraciones en el sistema renina-angiotensina. El papel de la angiotensina II en la programación fetal se ha demostrado en diversos modelos animales y pueden explicar las alteraciones orgánicas en la función renal y vascular. Por ejemplo, animales expuestos a desnutrición fetal presentan mayor respuesta vasopresora a angiotensina II (Edwards, McMillen 2001) y el desarrollo de hipertensión se previene tras el bloqueo de los receptores AT1 (Sherman,

Langley-Evans 2000) los cuales se ha demostrado que están sobreexpresados en estos animales (Vehaskari et al. 2004).

Modificaciones epigenéticas. Las modificaciones epigenéticas suponen cambios en la expresión génica, sin alterar la secuencia de ADN (Jaenisch, Bird 2003). Estudios en humanos y en animales de experimentación sugieren que los cambios epigenéticos son uno de los mecanismos responsables de la programación fetal y que podría explicar las alteraciones orgánicas arriba indicadas. Por ejemplo, se ha encontrado que una insuficiencia útero-placentaria produce alteraciones de la metilación de algunos genes y a una reducción en el número de nefronas (Gicquel et al. 2008). Otros estudios demuestran que la disfunción endotelial y otras alteraciones asociadas a la hipertensión se relacionan con una reducción en la metilación de genes que codifican para el receptor AT1 (Bogdarina et al. 2007). Estudios en humanos que sufrieron restricción calórica durante el periodo intrauterino, han demostrado modificaciones en la metilación del gen del insuline-like growth-factor IGF-2 (Heijmans et al. 2008).

Alteración del balance oxidativo. En tercer lugar, se ha postulado que el estrés oxidativo es otro de los nexos de unión más plausibles entre un crecimiento fetal adverso y un aumento del riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares y metabólicas en la edad adulta (Luo et al. 2006, Thompson, Al-Hasan 2012). El exceso de ROS podría explicar varias de las alteraciones orgánicas, por ejemplo la disfunción endotelial. De hecho se ha demostrado que ratas sometidas a restricción de proteína durante la gestación tienen menor respuesta a acetilcolina y que esto es debido a un exceso del radical anión superóxido (Franco et al. 2007, Nuyt 2008).

6.2 Dimorfismo sexual en la programación fetal de la hipertensión

La asociación entre un bajo peso al nacer e hipertensión se produce tanto en hombres como en mujeres (Intapad et al. 2014). Sin embargo, existen algunas evidencias que hacen sugerir que existe una influencia del sexo en la programación fetal de la HTA. La evidencia clínica muestra que los fetos masculinos tienen mayor riesgo de mortalidad perinatal en comparación con los fetos femeninos, las cuales se adaptan mejor a la vida extrauterina (Bracero et al. 1996, Bekedam et al. 2002, Stark et al. 2008, Zeitlin et al. 2004). Además,

los recién nacidos varones provenientes de embarazos patológicos o expuestos a contaminantes ambientales tienen peor pronóstico que las niñas (Sakamoto et al. 2001, Di Renzo et al. 2007).

Una de las diferencias encontradas entre ambos sexos, que podrían explicar una mayor susceptibilidad de los varones al estrés fetal, es su mayor tasa de crecimiento desde etapas tempranas de la gestación.

Ha sido postulado que el crecimiento más rápido de los fetos masculinos conlleva una mayor demanda energética por lo que, en situaciones de falta de nutrientes el crecimiento de los varones podría verse comprometido (Chen et al. 2012); además como consecuencia de un déficit de nutrientes puede haber un crecimiento placentario deficiente, lo que puede llegar a producir una insuficiencia del flujo al feto, comprometiendo su desarrollo en etapas posteriores (Eriksson et al. 2010).

A pesar de numerosos estudios epidemiológicos, no se ha llegado a un consenso acerca de la existencia o no de dimorfismo sexual en la programación fetal de la hipertensión. Las discrepancias pueden ser atribuidas a diferencias entre estudios relativas a la repercusión de distintos estresores durante la etapa fetal, la edad de los individuos incluidos en cada estudio, así como a la diferencia de edad en el inicio de la menopausia en distintas poblaciones (Dasinger, Alexander 2016). Por ello, los estudios en animales de experimentación son de interés, ya que es posible controlar muchos de los factores que pueden interferir en la interpretación de los resultados obtenidos en humanos, además de permitir realizar estudios a lo largo del tiempo.

7. Modelos experimentales de programación fetal

Para el estudio de los mecanismos que asocian estrés fetal con desarrollo de hipertensión y ECV en la edad adulta, se han desarrollado diversos modelos animales, en los que es posible llevar a cabo un estudio longitudinal. Existen diversas aproximaciones experimentales (Nuyt 2008, Dasinger, Alexander 2016). Entre las más utilizadas están:

Modelo de **restricción nutricional durante la gestación**. Puede llevarse cabo mediante la reducción global de la ingesta diaria (30% - 50%) o bien mediante una reducción de proteínas (reducción del 9-20%) o alguno de los micronutrientes de la dieta, complementando la deficiencia energética con una

mayor proporción de glúcidos para convertirla en una dieta isocalórica. En todos los casos, la intervención nutricional puede abarcar todo el periodo de gestación o sólo una parte, bien al inicio o al final del mismo.

Modelo de **insuficiencia placentaria**. Se lleva a cabo mediante la ligadura de las arterias uterinas en la rata gestante, lo que produce una disminución del aporte de sangre y por tanto de nutrientes al feto, mimetizando situaciones de preeclampsia.

Modelo de **hipoxia**. Se induce mediante reducción del aporte de oxígeno al feto, utilizando para ello cámaras hipobáricas en las que se reduce la presión parcial de oxígeno.

Modelo de **exposición a glucocorticoides**. Se induce mediante la inyección de glucocorticoides, dexametasona, betametasona, a la madre, en distintos momentos de la etapa gestacional.

Estos modelos han establecido que entre los factores de riesgo cardiovascular, la hipertensión es el factor que más consistentemente se asocia a un crecimiento intrauterino adverso debido a desequilibrios nutricionales.

Hipótesis y Objetivos

Hypothesis & Objectives

Justificación

Ha sido propuesto que la asociación entre una inadecuada nutrición en la etapa fetal y el desarrollo de hipertensión en la edad adulta puede estar relacionada con anomalías en el desarrollo vascular, en particular de la proteína elastina, ya que su periodo de síntesis se restringe a las etapas fetal y perinatal. Dicha propuesta está basada en estudios epidemiológicos pero no ha sido confirmada ya que requiere de un modelo experimental en el que puedan realizarse estudios longitudinales y experimentos *in vitro*.

Hipótesis

La inadecuada nutrición durante la vida fetal produce alteraciones de la estructura y mecánica arterial, que contribuyen a las diferencias de sexo en el desarrollo de hipertensión en la edad adulta. En estas alteraciones puede estar implicada una inadecuada deposición de la elastina.

Objetivos

El presente trabajo incluye dos tipos de objetivos. En primer lugar, unos objetivos científicos relacionados con la hipótesis de partida. Además, para llevar a cabo estos objetivos ha sido necesario realizar experimentos que requieren de un desarrollo y validación metodológicos.

Objetivos metodológicos

Validar métodos para evaluar la cantidad y organización del colágeno y de la elastina en la aorta, como elementos que contribuyen a las propiedades mecánicas vasculares. En concreto:

1. Determinar las condiciones óptimas para obtener simultáneamente colágeno y elastina de la aorta de rata de distintas edades, que permita la cuantificación de ambas proteínas y la realización de estudios funcionales de la elastina purificada.
2. Evaluar la utilidad de la microscopía confocal en el modo reflexión como herramienta de visualización y cuantificación del colágeno fibrilar.

Objetivos científicos

1. Evaluar los parámetros de crecimiento corporal en un modelo de desnutrición fetal en rata y las posibles diferencias de sexo.
2. Determinar la evolución de la presión arterial a lo largo de la edad desde el destete hasta el envejecimiento, analizando posibles diferencias entre sexos.
3. Establecer la posible relación entre desarrollo de hipertensión y alteraciones estructurales vasculares, tanto de las arterías de conducción como de las arterias de resistencia, analizando la influencia del sexo.
4. Establecer la posible relación entre desarrollo de hipertensión y alteraciones de la mecánica pasiva en arterias de conducción y de resistencia, analizando diferencias de sexo.
5. Evaluar el papel del colágeno y de la elastina en las alteraciones mecánicas vasculares encontradas.

Hypotheses and Objectives

Justification

Based on epidemiological studies it has been proposed that the association between inadequate nutrition in during fetal life and the development of hypertension in adulthood can be related to abnormalities in vascular development, in particular, of the protein elastin, since its period of synthesis is restricted to fetal and perinatal stages. This hypothesis has not been confirmed since it requires an experimental model in which longitudinal studies and *in vitro* experiments can be performed.

Hypothesis

Inadequate nutrition during fetal life causes alterations of arterial structure and mechanics, which contribute to sex differences in the development of hypertension in adulthood. An inadequate elastin deposition might be involved in these alterations.

Objectives

This paper includes two types of objectives. Firstly, scientific objectives related to the proposed hypothesis. In addition, to accomplish these objectives it has been necessary to conduct experiments to validate and improve methodology.

Methodological objectives

To validate methods for assessing the amount and organization of collagen and elastin in the aorta, as key elements for vascular mechanical properties, specifically:

1. To determine the optimum conditions to obtain simultaneously collagen and elastin from aorta of rats at different age points, allowing for quantification of both proteins and functional studies of the purified elastin.
2. To evaluate the utility of confocal microscopy in reflection mode as a tool for visualization and quantification of fibrillar collagen.

Scientific objectives

1. To evaluate body growth parameters in a rat model of fetal undernutrition and the possible sex differences.
2. To determine the evolution of blood pressure at different age points from weaning to old age, analyzing possible sex differences.

Hypotheses and Objectives

3. To establish the possible link between hypertension development and vascular structural alterations in both conduit and resistance arteries, analyzing the influence of sex.
4. To establish the possible relationship between hypertension development and alterations in conduit or resistance artery mechanical properties, analyzing sex differences.
5. To evaluate the role of collagen and elastin in the vascular mechanical alterations found.

Material y Métodos

1. Animales de experimentación

En este estudio se utilizaron ratas de la cepa Sprague-Dawley (SD) que se criaron en las instalaciones del Gabinete Veterinario de la Universidad Autónoma de Madrid, con número de registro EX021-U. Todos los procedimientos experimentales fueron autorizados por el Comité de Ética en Experimentación Animal de la Universidad Autónoma de Madrid, la Comunidad Autónoma de Madrid y fueron aprobados por el Comité de Ética en Experimentación Animal de la Universidad Autónoma de Madrid, de acuerdo con la Guía de Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (National Institutes of Health publication no. 85-23, revised in 1996), la Legislación Española (RD 1201/2005) y de la Directiva 2010/63/UE relativa a la protección de animales utilizados para fines científicos.

Los animales se alojaron en cubetas de Makrolon tipo III, con las siguientes medidas: 36.5 cm de largo, 21.5 cm de ancho y 18.5 cm de alto, las cuales se situaron en habitaciones con temperatura regulada (19-23 °C), humedad relativa controlada (35-45%) y con periodo 12/12h luz/oscuridad. El pienso utilizado para la alimentación de los animales fue el pienso especial de cría para rata y ratón SAFE A03, cuya composición es de 51.7% carbohidratos, 21.4% proteína, 5.1% lípidos, 3.9% fibra, 5.7% minerales y 12.2% humedad. El agua suministrada fue *ad libitum* en todos los casos.

Las cubetas y el lecho se cambiaron dos veces a la semana, siendo estos supervisados por el equipo de personal técnico del propio Gabinete Veterinario anotando cualquier alguna anomalía relativa al bienestar animal (cambios de peso, pelaje, aspecto general, comportamiento, etc.).

Todo el personal que ha participado en la realización de procedimientos experimentales con animales de laboratorio cumple con las exigencias de formación del Real Decreto (RD 2252/2005 de 21 de Octubre).

1.1. Modelo experimental de programación fetal

Se cruzaron ratas machos y hembras (no primerizas) de 4 meses de edad. El día que se observó el tapón vaginal se consideró como día 1 de gestación (G1). Hasta el día 10 de gestación (G10) todas la ratas tuvieron dieta de cría *ad libitum* y a partir de este momento se hicieron dos grupos experimentales: Grupo Control (C) que continuó con alimentación *ad libitum* a lo largo de todo el

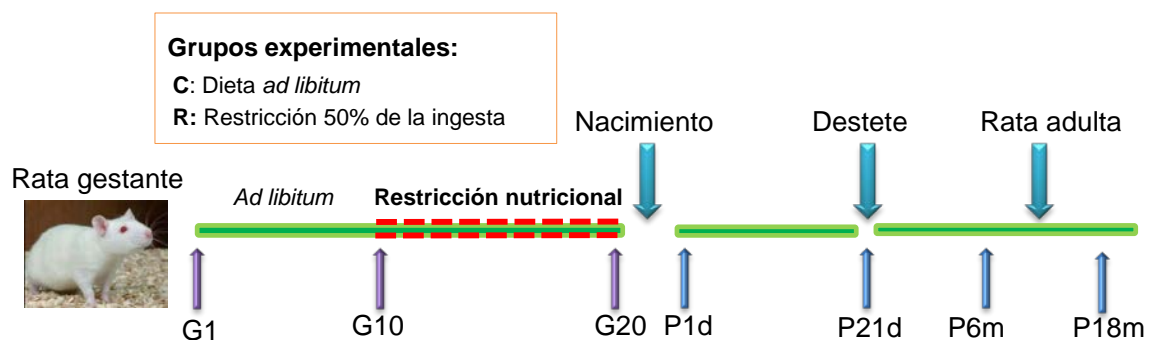
periodo gestacional y grupo Restricción nutricional (R) que fueron alimentadas con un 50% de la ingesta de las ratas control desde el día 11 hasta el parto (Rodríguez-Rodríguez et al. 2015).

Para calcular el 50% de la ingesta normal de pienso se realizaron experimentos previos en los que se constató que las ratas gestantes ingieren 24 g diarios durante la segunda mitad de la gestación. Por ello, al grupo R se le administraron 12 g por día desde el día 11 hasta el parto.

Todas las ratas gestantes se pesaron el día G10 y el día G20. Tras el parto todas las madres volvieron a la dieta de cría *ad libitum*. Al parto, las crías se sexaron, se pesaron y la camada se estandarizó a 12 crías: 6 machos y 6 hembras siempre que fuera posible.

En la figura 9 se muestra un esquema del modelo experimental utilizado, así como las edades de estudio.

Figura 9. Modelo experimental de programación fetal



G1, G10, G20: Días 1, 10, 20 de gestación; P1d, P21d: Días 1 y 21 postnatal; P6m y P18m: postnatal 6 y 18 meses

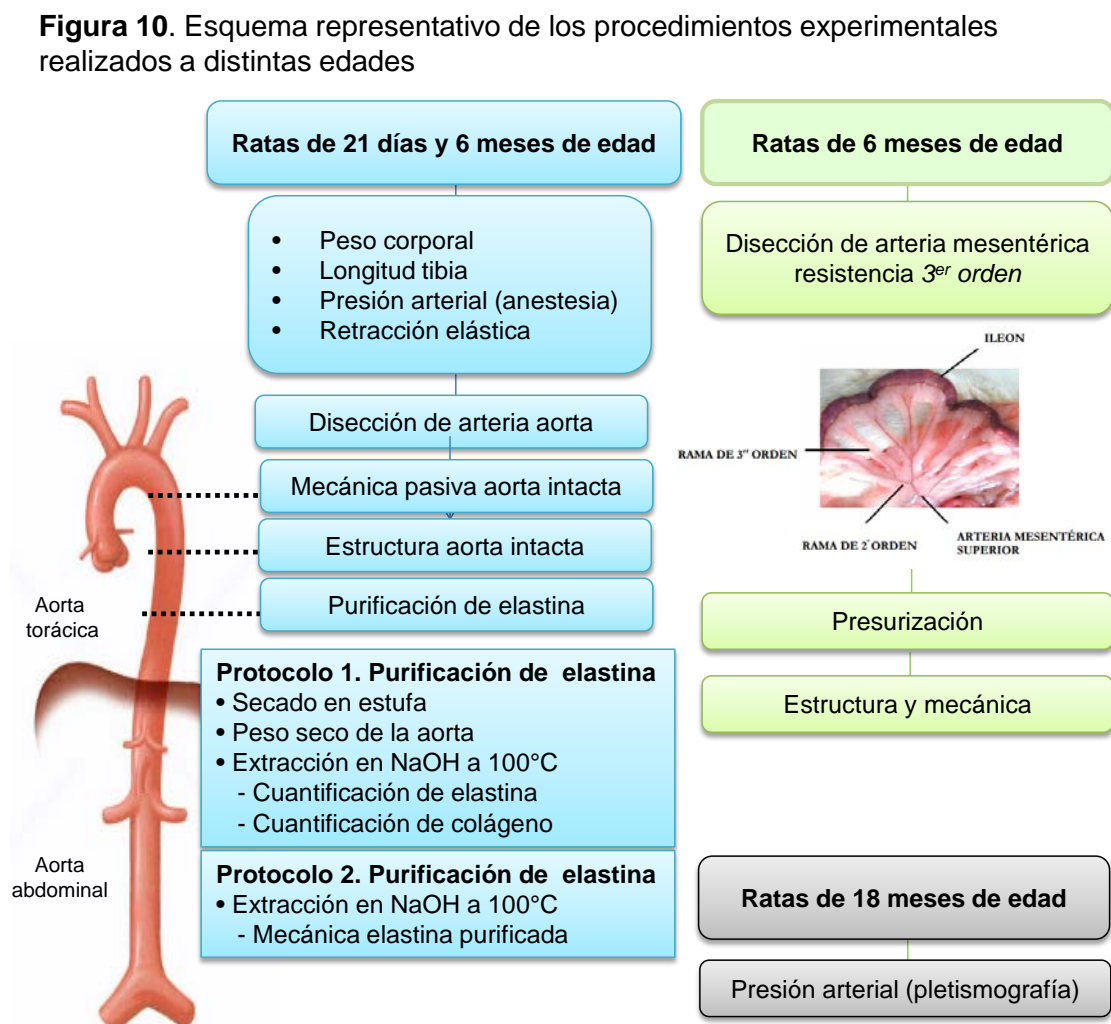
2. Organización de los experimentos

Los procedimientos experimentales se realizaron a los 21 días de edad, edad de destete (P21) y a los 6 meses (P6m) como edad adulta, analizando por separado machos y hembras. A estas dos edades, se realizaron las medidas de los parámetros cardiovasculares que se especifican más adelante. El resto de la camada se dejó crecer, siendo utilizado un grupo de ratas a los 18 meses de edad para estudiar la evolución de la presión arterial.

En un grupo de animales (de 21 días y de 6 meses de edad) se realizó la medida de la presión arterial en el animal anestesiado. Posteriormente, las crías fueron sacrificadas mediante inhalación de CO₂, para lo que fueron introducidas en una cámara conectada a una botella con CO₂. Una vez

certificada la muerte de los animales, cada rata se pesó (báscula Denver Instrument SI-8801) y a continuación, se procedió a practicar una toracotomía. Se colocó la rata boca arriba y se abrió la cavidad torácica y abdominal para la disección de los órganos. Bajo la lupa se retiraron las vísceras y se descubrió la aorta, se limpió el exceso de sangre con una gasa impregnada con solución salina. Se identificó el cayado aórtico y la bifurcación de la arteria iliaca para medir la retracción elástica de la aorta (ver protocolo más adelante). Posteriormente, se extrajo la arteria aorta que fue guardada en solución salina al 0.9% en frío hasta su utilización posterior. En las ratas de 6 meses también se extrajo el mesenterio, guardándose en salino frío para la posterior disección de la tercera rama de la arteria mesentérica de resistencia. Finalmente se extrajo la tibia para su medición con el calibre digital REN Nessler código 590061) como estimación del peso corporal.

En la figura 10 se indican los órganos utilizados y las mediciones llevadas a cabo en cada una de las edades de estudio.



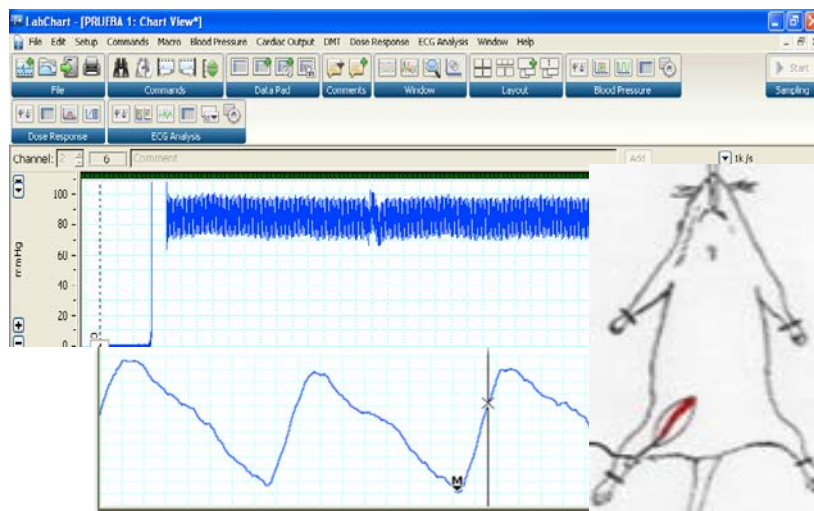
3. Protocolos

3.1. Medida de parámetros hemodinámicos

3.1.1 Medida de la presión arterial y la frecuencia cardíaca en la rata anestesiada

Se midieron de forma directa la presión arterial sistólica (PAS), presión arterial diastólica (PAD) y la frecuencia cardíaca (FC), en ratas anestesiadas con Ketolar® (Ketamina 50 mg/ml) y Domtor® (Medetomidina clorhidrato 1 mg/ml). Para ello se insertó en la arteria ilíaca derecha una cánula conectada a un transductor de presión (Statham, Harvard Aparatos GMBH, Alemania). La onda de presión arterial se registró en un ordenador PC, mediante el sistema de adquisición de datos con el programa Chart & Scope v5 PowerLab (ADI instruments) durante 60 minutos. La PAS, la PAD y la FC se midieron en la porción final del registro. En la Figura 11 se muestra un ejemplo representativo de la medida directa de la presión arterial en rata.

Figura 11 . Medida de la presión arterial en la rata anestesiada y ejemplo de representativo del registro



3.1.2. Medida de la Presión Arterial mediante pletismografía

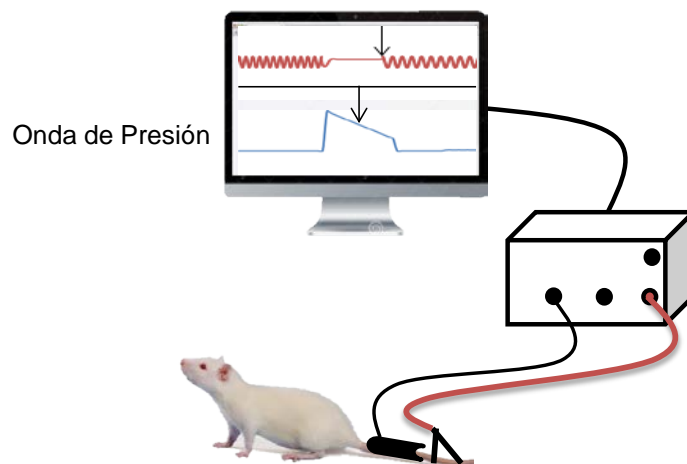
La medida de PAS fue realizada por pletismografía mediante el método indirecto con la ayuda de un esfingomanómetro y sensor de tipo pinza. El manguito del esfingomanómetro se sitúa en la parte posterior caudal del animal lo más próximo al cuerpo; la pinza-sensor se sitúa más alejada del manguito.

Tanto el esfingomanómetro como el sensor están conectados a un transductor (Cibertec® Niprem 645) que a su vez, se conecta con un software (Niprem®) para el análisis de los datos.

Previo a la toma de la PAS, se mantuvo a cada animal durante 20 minutos a 37°C sin humedad para producir la vasodilatación de las arterias caudales. Seguidamente, se colocó tanto el manguito como el sensor en las posiciones anatómicas mencionadas. Tras comprobar la presencia de pulso, se procedió a inflar el manguito a 220 mm de Hg; aquí la onda de pulso era plana. Posteriormente, se producía la bajada de la presión de forma paulatina hasta recuperar el pulso inicial, momento en el que se detenía la medida. El dato de la intersección entre la bajada de la onda de presión y la recuperación del pulso inicial fue tomado como PAS. Figura 12, ejemplo de medida de presión arterial por pletismografía.

Esta técnica puede ocasionar estrés en el animal, lo que podría interferir en la recogida de los datos; por este motivo, cada día se toman un total de 10 medidas consecutivas por animal. Las medidas se tomaron durante 3 días consecutivos, escogiéndose las medidas del último día.

Figura 12. Medida de la presión arterial sistólica mediante pletismografía

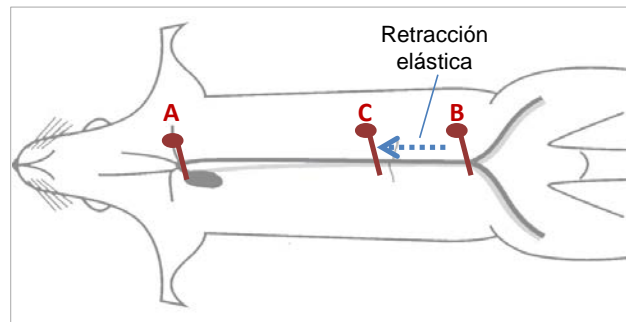


3.2. Medida de la retracción elástica de la aorta

La retracción elástica de la aorta se determinó calculando la diferencia de longitud de la aorta *in situ* y tras su disección. Para ello se localiza el cayado aórtico y a continuación se colocan dos alfileres entomológicos: el primero en el cayado aórtico (entre la tercera ramificación y arteria braquial) y el segundo alfiler en el extremo de la aorta abdominal (en la bifurcación de las arterias

iliacas). Una vez fijados los alfileres se mide su distancia con un calibre digital. Posteriormente se quita el segundo alfiler y se lleva a cabo la disección total de la aorta, separándola con cuidado del tejido adiposo circundante. A continuación se coloca la aorta diseccionada de forma paralela a la columna vertebral y se coloca otro alfiler en el extremo libre de la aorta para medir el tamaño de la aorta retraída. Este procedimiento se realizó intentando dejar el vaso lo más intacto posible para no interferir en los estudios de la función mecánica en segmentos vasculares de aorta. Una vez cortada la aorta se transfiere a una placa con solución salina en frío para su posterior utilización. En la Figura 13 se muestra un esquema de la medida de la retracción elástica de la aorta.

Figura 13. Medida de la retracción elástica de la aorta



La distancia A-B indica la longitud de la aorta previo a la disección, A-C indica la longitud de la aorta tras cortar el extremo distal y B-C indica la retracción elástica.

De la aorta torácica, la región inmediatamente posterior al cayado aórtico se utilizó para los estudios de mecánica pasiva. Para ello, con ayuda de una lupa binocular se cortan dos segmentos de 3-4 mm de longitud, anotando la medida exacta de cada uno de ellos, que se realiza con el ocular de la lupa y se guardan en salino. El segmento contiguo distal a los y 2 anteriores se guardó en paraformaldehído al 4% y se almacenó en nevera 2-4 °C para su posterior estudio mediante microscopía confocal. El resto de la aorta se almacenó para posterior purificación de la elastina.

3.3. Estudio de las propiedades mecánicas de la aorta en segmentos aislados

Las propiedades mecánicas de la aorta torácica se estudiaron mediante la realización de curvas tensión-deformación en segmentos arteriales de 3 mm de

longitud -adyacentes al cayado aórtico- según el método de Angus y Wright (Angus, Wright 2000).

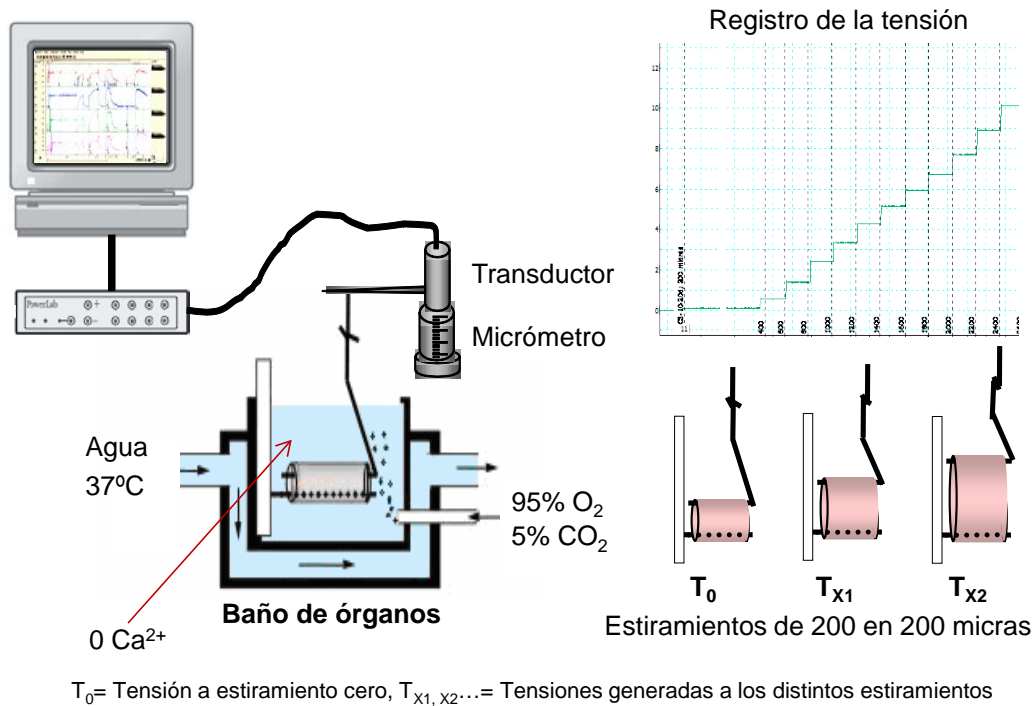
Los segmentos arteriales se introducen en baños de órganos que contienen 1ml de solución Krebs Henseleit (KH) (Glucosa, NaCl, KCl, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaHCO_3 , EGTA 0,1M) libre de calcio, para el registro de la tensión isométrica. Para ello, se introducen dos alambres de acero rígido, de 168 μm de diámetro, a través de la luz del segmento arterial. Uno de los alambres se fija a la pared del baño y el otro, que puede desplazarse de manera paralela al primero, se conecta con un transductor de fuerza (Piodem controls LTD. Dynamometer. Cibertec SA. España). El transductor, a su vez, es conectado a un amplificador y a un sistema de adquisición de datos Lab Chart® Scope V5 (AD Instruments) en el que se registran los cambios de tensión producidos por estiramientos sucesivos del segmento arterial.

La temperatura del baño de órganos se mantiene constante a $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$, mediante una doble pared por donde circula agua procedente de un termocirculador (Techna TE1 Tempeltec). La solución fisiológica contenida en los baños de órganos es burbujeada continuamente con carbógeno (95% O_2 y 5% CO_2) para proporcionar el oxígeno necesario y mantener un pH fisiológico (7,3-7,4).

Al principio de cada experimento, los alambres introducidos en la luz vascular se separaron hasta tocar la pared vascular pero sin generar tensión, reajustándose la separación entre alambres a lo largo de un periodo de 60-90 minutos hasta lograr su completa estabilización ($T=0$).

Posteriormente, los segmentos arteriales fueron sometidos a estiramientos sucesivos de 200 μm , dejando 3 minutos entre cada estiramiento, hasta la rotura del vaso o hasta el máximo permitido por el sistema, registrándose la tensión isométrica desarrollada en cada uno de los estiramientos. En la Figura 13 se representa de manera esquemática el sistema de baño de órganos utilizado y un ejemplo de los registros obtenidos.

Figura 13. Estudio de la relación tensión-deformación en aorta segmentos de torácica



Para el estudio de las propiedades mecánicas pasivas de la aorta se analiza la relación tensión/deformación -que se ajusta a una exponencial- según las siguientes fórmulas, adaptadas de (Angus, Wright 2000):

$$T_i = T_0 \exp \beta L_i$$

donde: T_i es la tensión circunferencial de la pared, es decir la fuerza (F) por unidad de longitud; β es equivalente al módulo elástico incremental de Young (E_{inc}), que indica el grado de rigidez de la pared vascular y L_i es la deformación calculada como circunferencia interna del vaso a cada estiramiento $x_1, x_2 \dots x_i$.

La T_i para cada estiramiento se calculó de acuerdo a la siguiente formula:

$$T_i = F_i / 2g, \text{ siendo } g \text{ la longitud del segmento (3 mm)}$$

Para calcular L_i , se utilizó la ecuación:

$$L_i = (\pi + 2) d + 2 (f_i)$$

donde d es el diámetro de los alambres y f es la separación entre ellos.

3.4. Determinación de la estructura de la aorta mediante microscopía confocal

3.4.1. Procesamiento de la muestra

De cada segmento de arteria aorta almacenado previamente en PFA al 4%, se cortaron 2 anillos con una cuchilla bajo la lupa. El segmento restante se cortó longitudinalmente y se tiñó con el colorante nuclear Dapi (1:500, de una solución madre 5 mg/ml; Life Technologies). En primer lugar los segmentos longitudinales se lavaron durante 10 minutos en solución salina, luego se sumergieron en la solución con Dapi durante 15 minutos y por último se hicieron 2 lavados con solución salina durante 10 minutos cada uno. Una vez completada la tinción, se procedió al montaje de anillos y segmentos de manera separada, en porta objetos en medio de montaje Citifluor (AF2 Life Technologies) para su posterior estudio mediante microscopía confocal. Los segmentos de aorta fijados a tensión se montaron sin tinción previa (Figura 15).

Figura 15. Protocolo de tinción, montaje y adquisición de imágenes en microscopia confocal



Adaptado de Arribas, 1997.

3.4.2. Visualización y cuantificación de la luz vascular y grosor de la túnica media

Se utilizó un microscopio confocal Leica® TCS SP2 acoplado a un microscopio invertido con fuentes de láser argón y helio-neón.

Para la cuantificación de la luz vascular los anillos de la arteria aorta se visualizaron con un objetivo x10 aire a la longitud de onda de 488nm excitación, 550 nm emisión que corresponde a la auto fluorescencia de la elastina (Arribas et al. 2008), capturándose una imagen de cada anillo. Para cuantificar el grosor de la media, los anillos se visualizaron con el objetivo x63 aceite zoom 2, capturándose 3 regiones distintas de la pared.

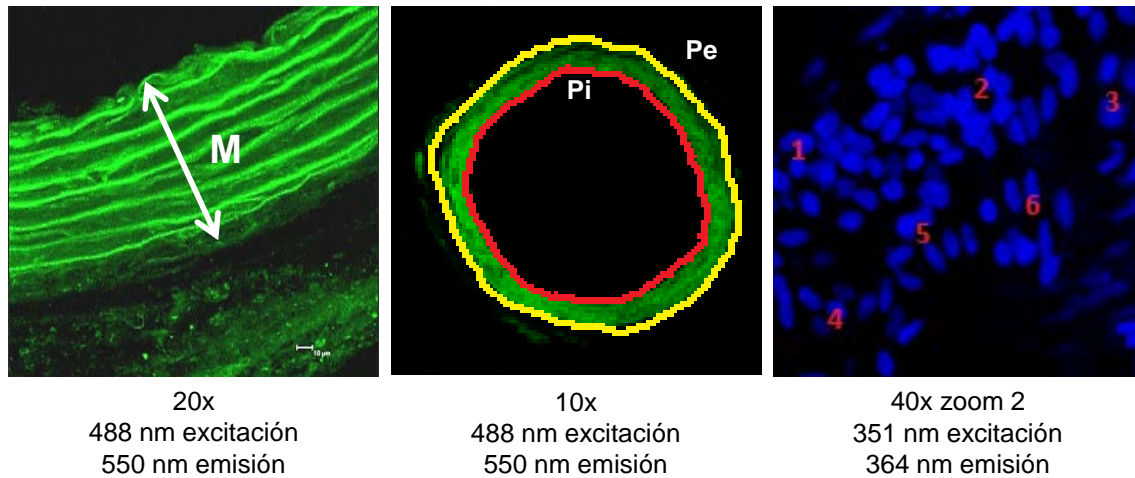
En las imágenes capturadas, se llevó a cabo la cuantificación utilizando el programa MetaMorph (MetaMorph® Microscopy Automation and Image Analysis Software). Los diámetros interno y externo se cuantificaron a partir de las medidas de los perímetros correspondientes. El grosor de la pared se cuantificó midiendo la distancia entra la lámina elástica interna y externa de los anillos (Figura 16).

3.4.3. Visualización y cuantificación de las células de la túnica adventicia

Los segmentos longitudinales de aorta se utilizaron para determinar el número de células y la densidad de las mismas en la túnica adventicia, así como el grosor de la misma. Para ello, los segmentos se montaron en pocillos conteniendo citifluor con la capa adventicia en contacto con el cubreobjetos. La visualización se realizó mediante el objetivo 40x aceite con zoom 2, a la longitud de onda de 358 nm excitación, 461 nm emisión (Dapi). De cada segmento se obtuvieron secciones ópticas seriadas de 1 μ m de grosor de toda la adventicia, desde la primera hasta la última célula visible. (3 regiones por cada segmento) (Arribas et al. 1997).

La cuantificación del número de células y el grosor de la túnica adventicia se realizó, mediante el Programa MetaMorph, en el conjunto de imágenes seriadas. La densidad celular se calculó por unidad de volumen calculado como el área de la imagen multiplicado por el grosor de la adventicia (Figura 16).

Figura 16. Ejemplos representativos para el análisis de la estructura de la aorta mediante microscopía confocal



Pi y Pe, perímetros interno y externo respectivamente; M, grosor de la túnica media, 1,2,3...contaje de células de la túnica adventicia

3.4.4. Visualización y cuantificación del colágeno

Para determinar la organización del colágeno fibrilar y la lámina elástica interna de la aorta se utilizaron segmentos arteriales sometidos a un estiramiento submáximo, previo a la rotura del vaso. Este estiramiento submáximo se dedujo de las curvas tensión/deformación, observándose que, en el caso de aorta de ratas de 21 días de edad el estiramiento corresponde a 5 mm y, en el caso de las aortas de ratas de 6 meses de edad, a 8 mm. Tras someter al estiramiento correspondiente a cada uno de los segmentos de aorta, éstos se fijaron en PFA al 4% durante 1h y se guardaron hasta su visualización mediante microscopía confocal.

Se realizaron secciones longitudinales de los segmentos vasculares, los cuales se montaron como se ha descrito en apartados anteriores con la capa adventicia en contacto con el cubreobjetos.

En primer lugar se determinó si las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal (modo reflexión) eran similares a las obtenidas mediante microscopía multifotón (modo segunda armónica). Para ello, se utilizó un microscopio multifotón (Zeiss LSM 780 directo con MaiTai DS) que puede usarse en ambos modos. Se obtuvieron secciones ópticas de 1 μm de grosor desde la parte más externa de la adventicia hasta una profundidad de 25 μm , con un objetivo de 20x de agua y zoom 3. Las imágenes se recogieron, a la longitud de onda de excitación de 488nm recogiendo la luz reflejada a la misma longitud de onda.

Posteriormente, en la misma región, se obtuvieron las imágenes en el modo segunda armónica. Ambas imágenes se reconstruyeron mediante el programa de imagen Imaris Bitplane (Zen 2010, MATLAB, or Imaris, Bitplane AG, Zurich, Switzerland) para crear una versión de la imagen en 3D de la pared arterial.

Una vez determinado que la reflexión permite visualizar las fibras de colágeno de manera similar a la segunda armónica, se realizaron experimentos en el microscopio confocal TCS SP2 en condiciones similares a las descritas anteriormente pero con un objetivo 20x de inmersión de aceite zoom 2. Para estos experimentos se obtuvo un conjunto de imágenes seriadas de 1 μm de grosor desde la capa más superficial de la adventicia hasta una profundidad de 25 μm , en 3 regiones elegidas al azar. Las imágenes se capturaron en las mismas condiciones (ganancia e intensidad) para todos los grupos experimentales.

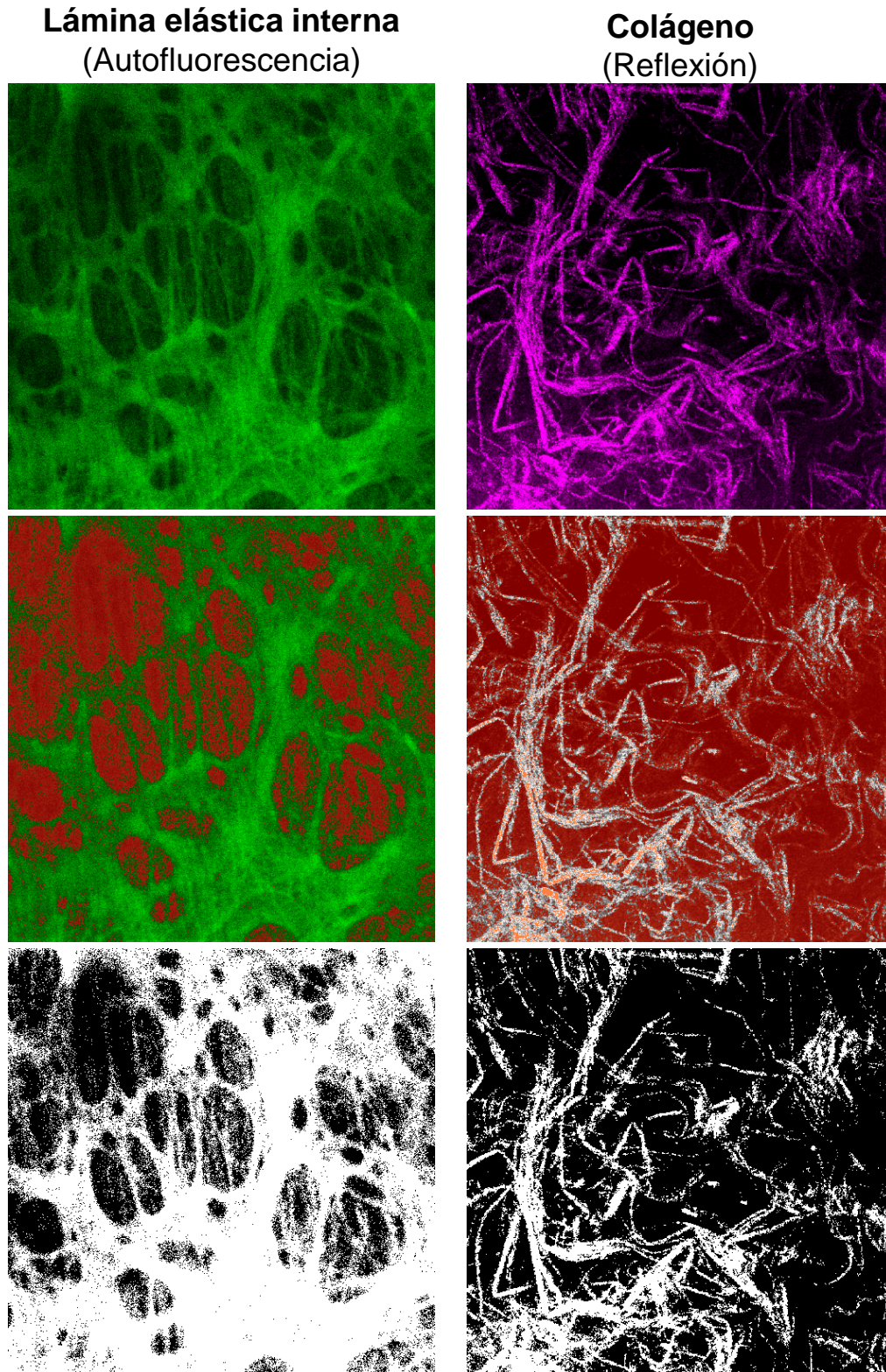
La cuantificación de las fibras de colágeno se realizó en las imágenes correspondientes a la región más externa y más interna capturadas de la adventicia. Todas las imágenes se segmentaron al mismo umbral y se transformaron en imágenes binarias mediante el programa de análisis de imagen MetaMorph. En las imágenes binarias se cuantificó la cantidad relativa de fibras (blanco) respecto del fondo (Figura 17).

3.4.5. Visualización y cuantificación de la lámina elástica interna

Los segmentos vasculares fijados a tensión submáxima se montaron en un portaobjetos con medio de montaje Citifluor con el endotelio en contacto con el cubreobjetos. La lámina elástica interna se visualizó con un objetivo x20 aceite zoom 8 a la longitud de onda de 488nm excitación, 550 nm emisión, capturándose imágenes de 3 regiones al azar.

La cuantificación del área relativa ocupada por la elastina se realizó segmentando todas las imágenes al mismo umbral y obteniendo las imágenes binarias correspondientes mediante el programa MetaMorph. En las imágenes binarias se cuantificó la cantidad relativa de elastina (blanco) respecto del fondo (Figura 17).

Figura 17. Medida de la cantidad relativa de elastina y colágeno mediante imágenes binarias



En la parte superior se muestran las imágenes originales obtenidas mediante microscopía confocal obtenidas con un objetivo de x20 (zoom 8 para elastina y zoom 2 para colágeno). En el centro las imágenes segmentadas y en la parte inferior las imágenes binarias.

3.5. Purificación de la elastina de la aorta

La purificación de la elastina de la aorta se llevó a cabo utilizando dos protocolos distintos, en función de si se pretendía determinar el contenido en elastina de la aorta o si se querían estudiar el comportamiento elástico de esa elastina.

Ambos protocolos han sido puestos a punto en nuestro laboratorio y están basados en el sistema clásico de extracción de elastina mediante incubación con hidróxido de sodio (NaOH) a alta temperatura (Mecham et al. 2008). En primer lugar se hicieron estudios preliminares para determinar el tiempo óptimo de incubación de la aorta de ratas de distintas edades; para aorta de ratas de 21 días de edad se realizaron pruebas utilizando 15, 30 y 45 minutos de incubación; para las ratas de 6 meses de edad se hicieron pruebas de 30, 45 y 60 minutos. A cada uno de los tiempos se determinó si quedaba colágeno en los segmentos utilizando anticuerpos anti-colágeno y se visualizó la elastina para comprobar su degradación (mediante microscopia confocal).

En todos los casos, para la optimización de la purificación de la elastina de la aorta se analizaron, mediante microscopía confocal, los siguientes aspectos:

1) presencia de células; 2) presencia de colágeno y 3) estructura de la elastina. Para ello, los segmentos se incubaron con anticuerpos anticolágeno I y III (Santa Cruz, Life Technologies) durante cierto tiempo seguido de lavado.

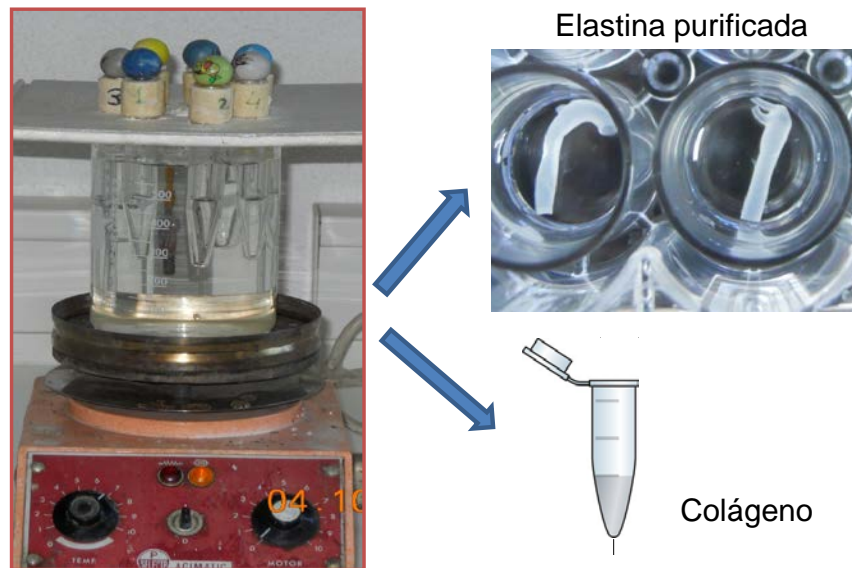
Tras el análisis anterior se determinó que el tiempo óptimo de incubación para la extracción de elastina es de 30 minutos para las aortas de ratas de 21 días y 45 minutos para las aortas de ratas adultas, se desestimaron aquellos tiempos en los que seguían apareciendo células o colágeno y aquellos en los que la elastina estaba totalmente degradada (Rodríguez-Rodríguez et al. 2013).

3.5.1. Purificación de la aorta para la cuantificación de la elastina y cuantificación de colágeno mediante Dot Blot

En primer lugar se secó la arteria aorta, en una estufa a 80°C, durante un tiempo superior a 30 minutos (tiempo establecido mediante estudios preliminares) y se pesó. A continuación se introdujo la aorta en un tubo falcon con 1 ml de NaOH 0.1N a 100°C en un baño maría, durante 30 minutos en el caso de aorta de ratas de 21 días y 45 min en el caso de ratas adultas, tapando los tubos para evitar la evaporación. Una vez transcurrido el tiempo, se sacaron

los tubos del baño maría y se pusieron en hielo para detener la reacción. La elastina purificada se secó en la estufa a 80 °C y se pesó. El peso relativo de elastina se calculó según: peso elastina/peso aorta. El extracto de sosa que contiene los demás elementos de la pared vascular, excepto elastina, se congeló para la posterior cuantificación de la cantidad de proteínas totales y de colágeno (Figura 18).

Figura 18. Método de extracción simultánea de elastina y colágeno vascular



El colágeno se cuantificó en el extracto de sosa de acuerdo con el protocolo diseñado por nuestro grupo de investigación (Rodríguez-Rodríguez et al. 2013). En primer lugar se prepararon las distintas soluciones en el protocolo de ácido tricloro acético (TCA Sigma-Aldrich, Ref. T6399), rojo sirio (Sigma-Aldrich, Ref. 365548) en ácido pícrico (Sigma-Aldrich, Ref. P6744) y gelatina (Sigma-Aldrich, Ref. G2500).

Se utilizó una membrana PVDF (BioRad, Ref. 162–0177) para el ensayo de Dot-Blot, usando una falsilla con puntos para orientar la carga de la muestra en la membrana. Se realizaron los siguientes pasos:

- Incubación de la membrana en metanol durante 1 minuto
- Incubación con agua durante dos minutos en agitación.
- Secado de la membrana a temperatura ambiente
- Adición de 1µl de la muestra en la membrana guiado con la falsilla

- Incubación de la membrana en una cubeta con la solución de rojo sirio durante 30 minutos a 4°C
- Lavados con agua destilada hasta la eliminación del rojo sirio
- Lavados durante 1 minuto con TCA en agitador magnético.
- Lavados con agua 3 veces para eliminar la acetona (Mini-Shaker 3D, BOECO, Germany)

Finalmente, se escaneó la membrana (Scanjet 2400, HP, USA) para su posterior cuantificación mediante el programa de análisis de imagen ImageJ® (versión 1.48q). La cantidad de colágeno se expresó en relación a la cantidad de proteína de la muestra medida por Bradford.

Cuantificación de proteína mediante método Bradford

La medida del contenido de proteína en los homogeneizados se realizó por el método descrito por Bradford (Bradford 1976), utilizando albúmina bovina (BSA Sigma-Aldrich, Ref. A2153-10G) para establecer una curva estándar. Este método se basa en la valoración de la máxima absorbancia de una solución acidificada por azul brillante de Coomassie G-250 (Bio-Rad, Ref. 161-0787) que cambia su longitud de onda de emisión de 465 nm a 595 nm cuando se une a la proteína. La diferencia de densidad óptica entre el complejo colorante-proteína y el colorante libre se correlaciona linealmente con la cantidad de proteína en un rango comprendido entre 1 y 100 µg.

La disolución de Bradford para la cuantificación de proteína se preparó a partir del stock comercial, utilizando una dilución 1:4 según instrucciones del fabricante. Asimismo se preparó la solución stock de albúmina bovina 1mg/ml, con la que se realizó una curva estándar entre 0 µg/µL y 0,5 µg/µL, almacenándose alícuotas de 500 µL a -20° C hasta su uso.

Un volumen final de 10µL de muestra o estándar se colocaron en los pocillos de una placa y se mezclan con 200µL de Bradford (Bio-Rad, Ref. 500-0006) (diluido 1:4 con agua). La absorbancia a 595 nm se midió, en un lector de placas multidetección SynergyTM HT, antes de 30 minutos.

3.5.2. Purificación de la elastina para el estudio de sus propiedades mecánicas

El método utilizado para la purificación de la elastina de la aorta fue similar al indicado anteriormente pero, en este grupo de experimentos, no se secó la arteria aorta para no dañar la elastina purificada. En este caso, la aorta se sometió directamente al tratamiento con NaOH 0.1N a 100°C en un baño maría, durante 30 minutos para aorta de ratas de 21 días y 45 minutos para aorta de ratas de 6 meses. A continuación se guardó en nevera en agua destilada con azida sódica 10mM para evitar su degradación por microorganismos hasta su utilización posterior en el sistema de baño de órganos y en el microscopio confocal.

Para el estudio del comportamiento mecánico de la elastina purificada se utilizaron el segmento inmediatamente posterior al cayado de la aorta sometiendo el segmento de elastina purificada a estiramientos progresivos hasta la rotura o hasta el máximo permitido por el sistema.

3.5.3. Estudio de la mecánica vascular de la elastina purificada de aorta

Una vez purificada la elastina se obtuvieron segmentos de 3 mm de longitud y se montaron en un baño de órganos. El estudio de la relación tensión-deformación de segmentos de elastina purificada se llevó a cabo mediante el registro de la tensión isométrica en ausencia de calcio con el mismo protocolo que se utilizó para el estudio de las propiedades mecánicas de la aorta intacta (Arribas, 2008).

3.6. Estudio de la estructura y mecánica de la arteria mesentérica de resistencia

3.6.1. Miografía de presión

Se realizó la disección de segmentos de la tercera rama del mesenterio, de 2-3 mm de longitud. Los segmentos vasculares fueron canulados en micropipetas de vidrio que están sumergidas en un baño de perfusión, de un miógrafo de presión (Modelo P100, J.P. Trading I/S. Aarhus, Denmark). Se utilizó solución KH libre de calcio, burbujeada con carbógeno y mantenida a 37°C. Esta cámara de perfusión está conectada a un controlador de presión y acoplada a un microscopio (Zeiss) y una cámara digital CCD-cooled (Cool-Snap) que nos

permitió tomar imágenes del segmento a cada una de las presiones estudiadas.

En primer lugar la arteria se estabilizó durante 40 min a una presión de 70 mmHg. Transcurrido este tiempo, se obtuvo una curva presión-diámetro aplicando diferentes presiones intraluminales (5, 20, 40, 60, 80, 100, 120 y 140 mmHg) durante 3 minutos cada una de ellas, obteniéndose una imagen de la arteria a cada presión. Posteriormente la arteria se fijó en PFA al 4% durante 1h a una presión intraluminal de 70 mm Hg para la posterior observación mediante microscopía confocal (Figura 19).

A partir de las imágenes obtenidas se midieron los diámetros interno y externo del vaso a cada una de las presiones intraluminales utilizadas, cuantificándose a partir de ellos el área de la sección de corte.

A partir de los valores de presión y los cambios de diámetro interno correspondiente se calculó la relación tensión-deformación de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$T_i = T_0 \exp \beta D_i,$$

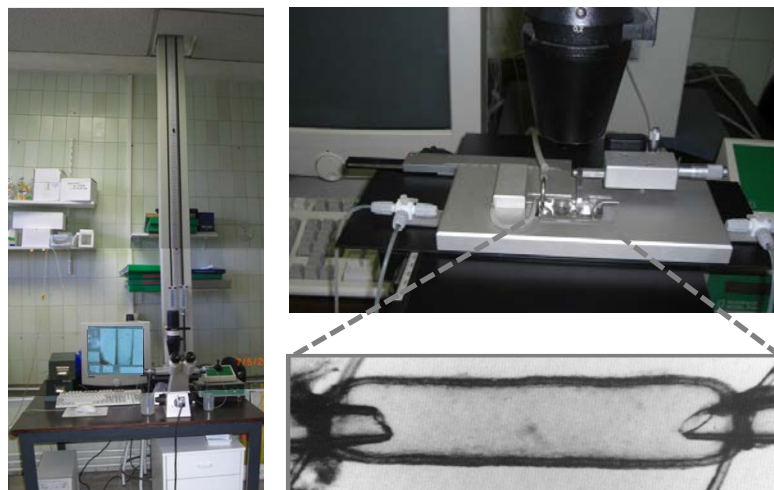
donde: T_i es la tensión circunferencial de la pared; T_0 es la tensión a 5 mmHg; β es equivalente al módulo elástico incremental de Young (E_{inc}), que indica el grado de rigidez de la pared vascular y D_i es la deformación calculada como incremento del diámetro del vaso a cada presión.

La T_i y D_i se calcularon de acuerdo con las siguientes fórmulas:

$$T_i = (P_i \times d_i) / 2 G_i$$

$D_i = (d_i - d_0) / d_0$, siendo d_i el diámetro y G_i el grosor de la pared a cada presión (P_i) y d_0 el diámetro a presión 5 mm Hg

Figura 19. Sistema de miografía de presión y ejemplo de arteria mesentérica presurizada



3.6.2. Estudio mediante microscopía confocal

Para estudiar la distribución y cuantificación de las células de la pared, la arteria presurizada se tiñó con colorante nuclear Dapi (1:500, de una solución madre 5 mg/ml) en la oscuridad. La arteria se montó en un portaobjetos con un pocillo con citifluor para su observación en el microscopio confocal con un objetivo 40x aceite con zoom 2, obteniendo 3 stacks por cada rata secciones ópticas de 1 micra de grosor (3 regiones aleatorias por cada rata). Se recogieron desde la primera célula de la adventicia hasta la última célula antes de llegar al endotelio. En estas imágenes obtenidas se estimó el grosor y el número de células de la capa media y de la adventicia mediante el programa de análisis de imagen Metamorph. Posteriormente se calculó la densidad teniendo en cuenta el volumen de la adventicia, que se calculó multiplicando el área de la imagen por su grosor.

Para el estudio de la organización de la organización de la lámina elástica interna los segmentos presurizados se visualizaron con un objetivo de 20x utilizando la longitud de onda de 488nm excitación, 550 nm emisión mediante la autofluorescencia de la elastina. De cada arteria se obtuvieron 2 imágenes de la lámina elástica interna de dos regiones aleatorias. En dichas imágenes, el área y número de las fenestras se cuantificó mediante el programa de análisis de imagen ImageJ y la intensidad de la elastina con el programa Metamorph.

4. Análisis estadístico

Tamaño muestral. El tamaño muestral se calculó basándonos en la variabilidad de los datos. Respecto de la estructura de la pared se tomó como referencia la variable número de células, que por experiencia previa es el parámetro que presenta mayor variabilidad. Para detectar diferencias significativas entre las medias de los grupos con una probabilidad de error tipo alfa del 5% y una potencia del 80%, el tamaño muestral necesario se ha calculado en un mínimo de 10 animales por cada grupo de comparación. En cuanto al estudio de parámetros hemodinámicos se requiere un tamaño muestral en torno a 7-8 ratas por grupo experimental.

Los resultados obtenidos se expresaron como la media aritmética \pm el error estándar de la media aritmética. Las comparaciones de los resultados obtenidos entre grupos individuales se realizaron mediante el análisis de la

Material y Métodos

varianza de una vía (ANOVA 1 vía) o el test de la t de Student. Para comparaciones múltiples se utilizó el test de Bonferroni. Para la comparación entre grupos individuales con dos variables se realizó un análisis de varianza de dos vías (2-ANOVA).

El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa GraphPad Prism 5 (GraphPad software, CA, USA). Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

Resultados

1. Parámetros de crecimiento corporal

1.1. Ratas gestantes

A mitad de la gestación (día 11G), periodo en el que todas las ratas tuvieron dieta ad libitum, las ratas R no presentaron diferencias significativas P en el peso corporal respecto a las ratas control (C=289.1±17.8 g, n=8) R=273.4 ±17.8 g, n=11) p= 0,3321. Sin embargo, al final de la gestación (día 21G), las ratas R, sometidas a restricción nutricional desde el día 11G, tuvieron un peso corporal significativamente menor que las ratas Control (C=385.9±18.1 g, n=9; R=303.7 ±9.6 g, n=11 p= 0,003).

1.2. Crías

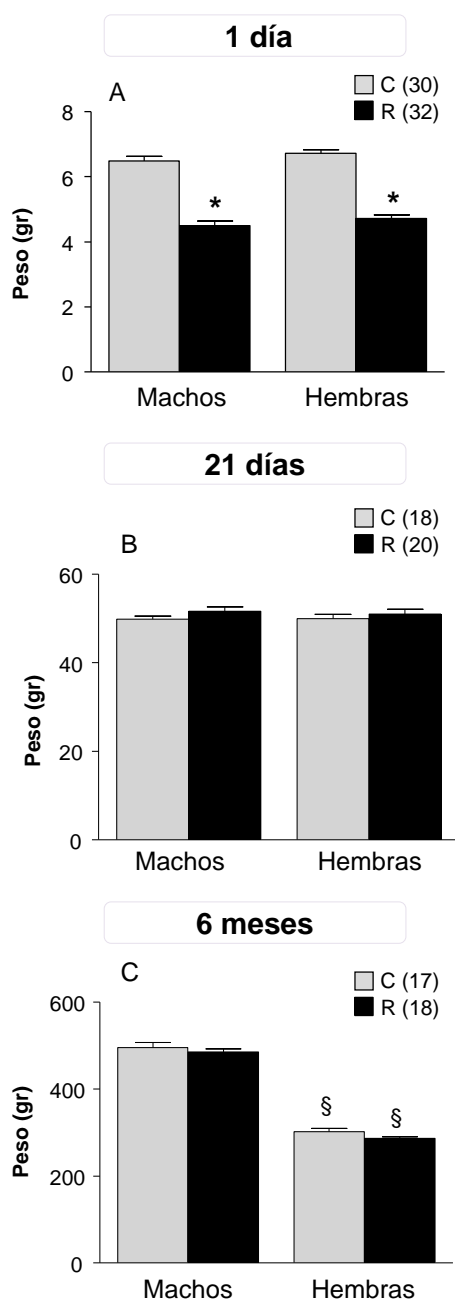
1.2.1. Peso corporal

Al nacimiento, día 1 postnatal (P1), los descendientes de ratas R tuvieron un peso corporal menor (un 36% más pequeño) comparado con los descendientes del grupo C. A P1 no hubo diferencia significativa de peso corporal entre descendientes machos y hembras del grupo R ni del grupo control. (Figura 20-A)

Al destete (día 21 postnatal, P21) no se observaron diferencias significativas en el peso corporal de los animales del grupo R respecto al grupo C, tanto en machos como en hembras. A P21 tampoco se detectaron diferencias estadísticamente significativas de peso corporal entre machos y hembras del grupo C ni del grupo R. (Figura 20-B)

A los 6 meses de edad, no hubo diferencias estadísticamente significativas en el peso corporal entre ratas R y Control, tanto machos como hembras. En ambos grupos experimentales las hembras tuvieron un peso menor que los machos. (Figura 20-C)

Figura 20. Peso de las crías al nacimiento, a los 21 días y 6 a los meses de edad



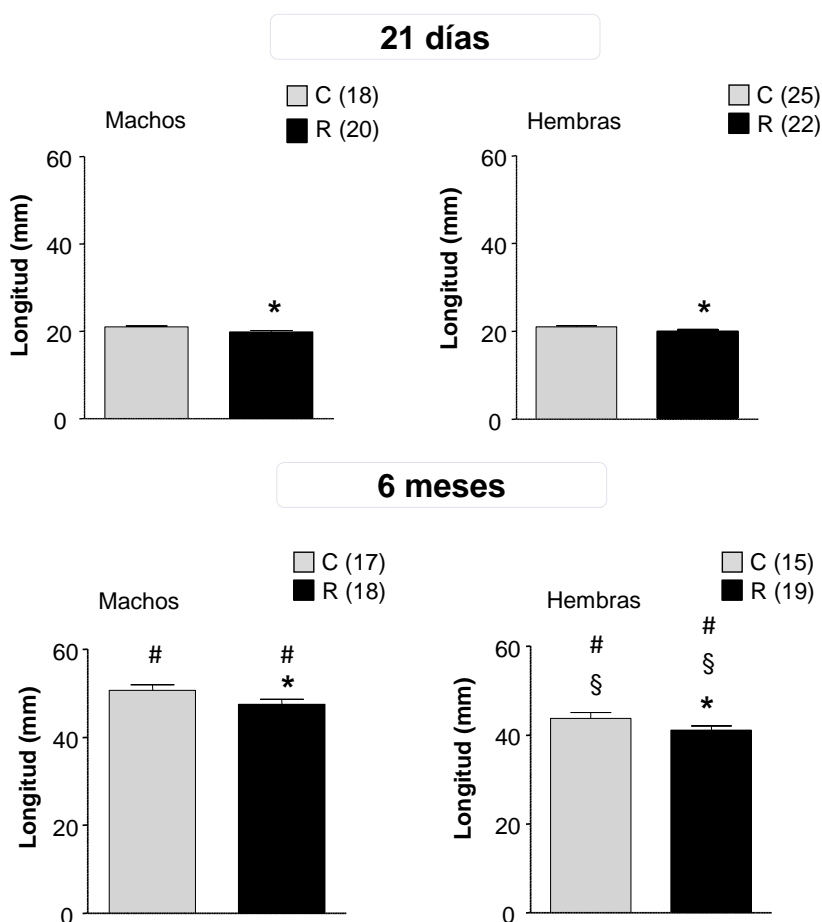
C, ratas control; R, ratas sometidas a restricción nutricional. Entre paréntesis el número de animales utilizado; * $p < 0.05$ respecto a C; § $p < 0.05$ respecto a machos.

1.2.2. Longitud de la tibia

A día P21, la longitud de la tibia fue significativamente menor en los animales del grupo R respecto a los del grupo control, tanto machos como hembras.

A los 6 meses de edad, las ratas R, tanto machos como hembras, presentan una longitud de la tibia significativamente menor que las ratas C. La longitud de la tibia fue significativamente menor en hembras C y R respecto de sus respectivos machos. (Figura 21)

Figura 21. Longitud de la tibia de ratas C y R de 21 días y 6 meses de edad



C, ratas control; R, ratas sometidas a restricción nutricional. Entre paréntesis el número de animales utilizado; * $p < 0.05$ respecto a C; § $p < 0.05$ respecto a machos; # $p < 0.05$ respecto a 21 días.

2. Parámetros hemodinámicos

En ratas de 21 días y 6 meses de edad se llevó a cabo la medida de la presión arterial y de la frecuencia cardiaca en el animal anestesiado. En ratas de 18 meses de edad se midió la presión mediante pletismografía.

2.1. Presión arterial y frecuencia cardiaca en el animal anestesiado

A los 21 días de edad no se observan diferencias significativas en la presión arterial sistólica (PAS) ni en la presión arterial diastólica (PAD) entre el grupo control y el grupo R, ni en machos ni en hembras. Tampoco se observan diferencias significativas en la frecuencia cardiaca (Tabla 1 FC).

A los 6 meses de edad, los machos R presentan mayor PAS y PAD en comparación con el grupo Control. Sin embargo, no se observan diferencias significativas en la PAS y PAD entre hembras R y C. Tampoco se detectaron diferencias significativas en la frecuencia cardiaca entre ratas R y C, ni en machos ni en hembras (Tabla 1 FC).

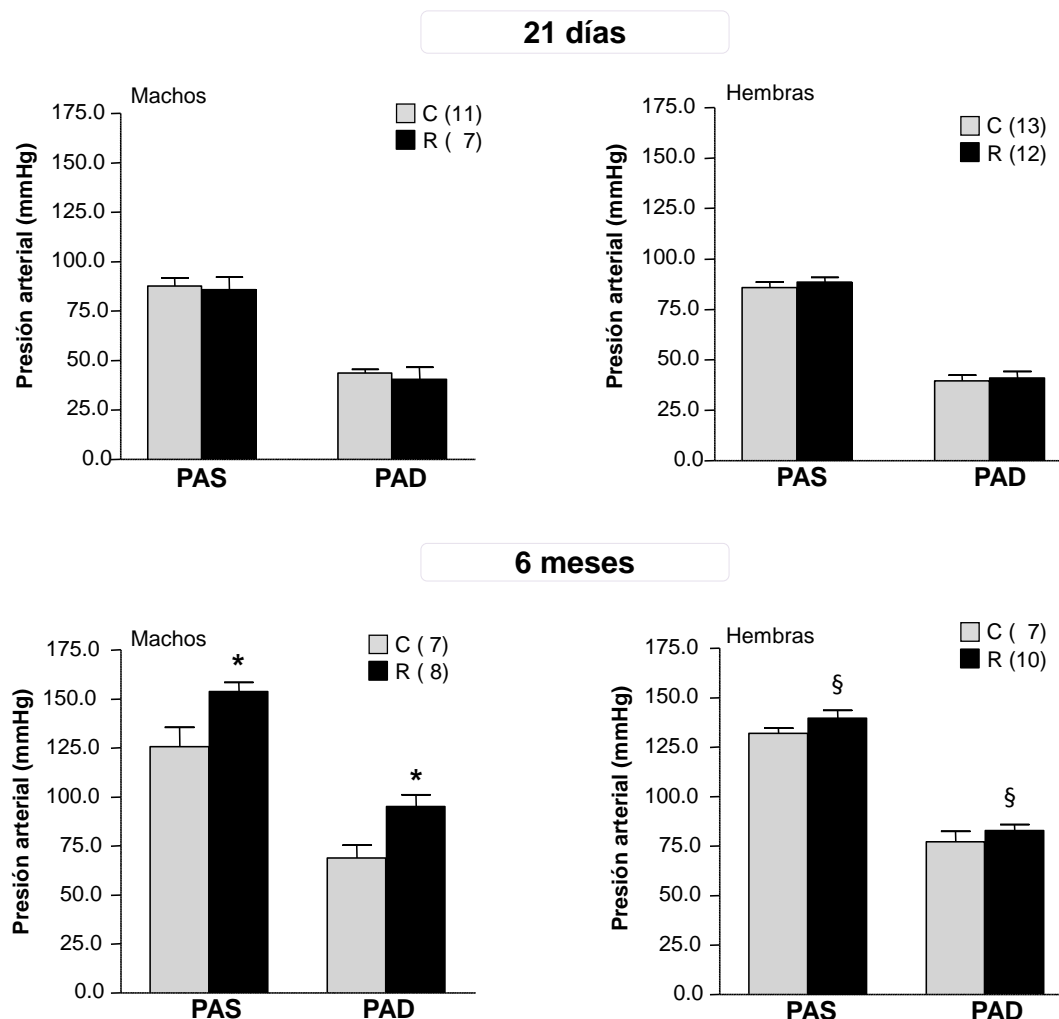
La presión arterial fue significativamente mayor en ratas de 6 meses comparadas con ratas de 21 días de edad en todos los grupos experimentales. En cambio, la frecuencia cardiaca disminuyó significativamente con la edad. Figura 22

Tabla 1. Frecuencia cardiaca en ratas C y R de 21 días y 6 meses de edad

	Machos C	Machos R	Hembras C	Hembras R
21 días	308±26 (n=11)	391±18 (n=7)	311±20 (n=13)	327±18 (n=12)
6 meses	258±8 # (n=7)	254±10 # (n=8)	222±10 # (n=7)	221±11 # (n=10)

C, ratas control; R, ratas sometidas a restricción nutricional. Entre paréntesis el número de animales utilizado; # p<0.05 respecto a ratas de 21 días.

Figura 22. Presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) en ratas C y R de 21 días y 6 meses de edad



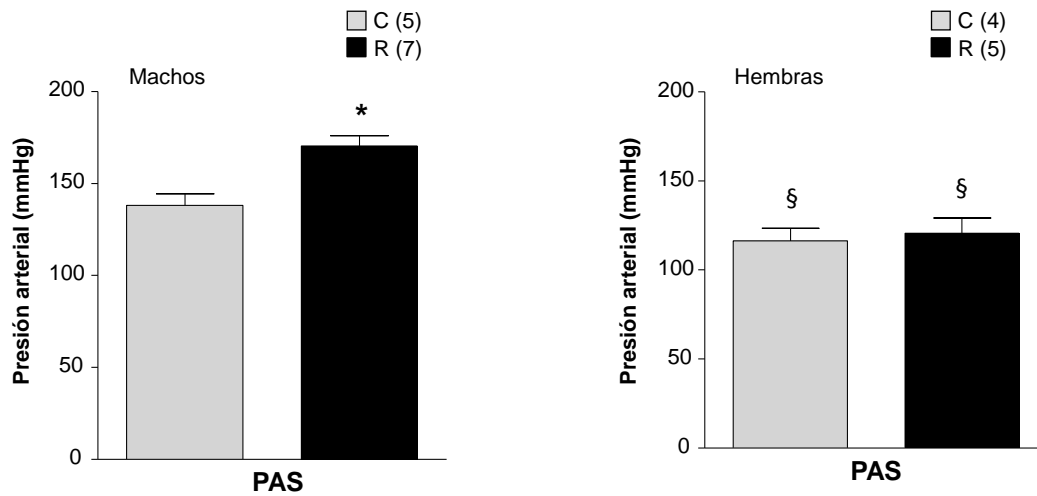
C, ratas control; R, ratas sometidas a restricción nutricional. Entre paréntesis el número de animales utilizado; * $p < 0.05$ respecto a C; § $p < 0.05$ respecto a machos

2.2. Presión arterial en el animal despierto

En ratas de 18 meses de edad, la presión arterial medida en la cola mediante pletismografía, fue significativamente mayor en ratas R machos comparadas con su control. No se encontraron diferencias significativas en los valores de presión arterial entre hembras C y R.

La presión arterial de las ratas hembra tanto R como C fue significativamente menor respecto a machos. (Figura 23)

Figura 23. Presión arterial sistólica de ratas de 18 meses de edad



C, ratas control; R, ratas sometidas a restricción nutricional. Entre paréntesis el número de animales utilizado; * $p < 0.05$ con respecto al control; § $p < 0.05$ respecto a machos

3. Estudios en la arteria aorta

3.1. Estructura

Diámetros interno y externo

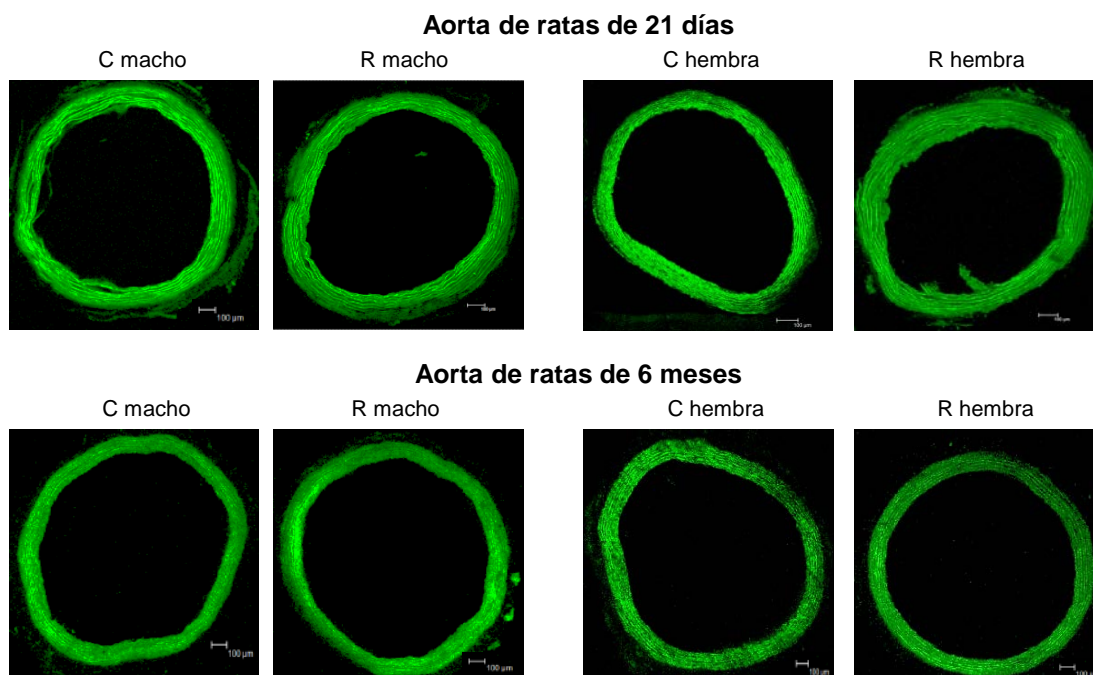
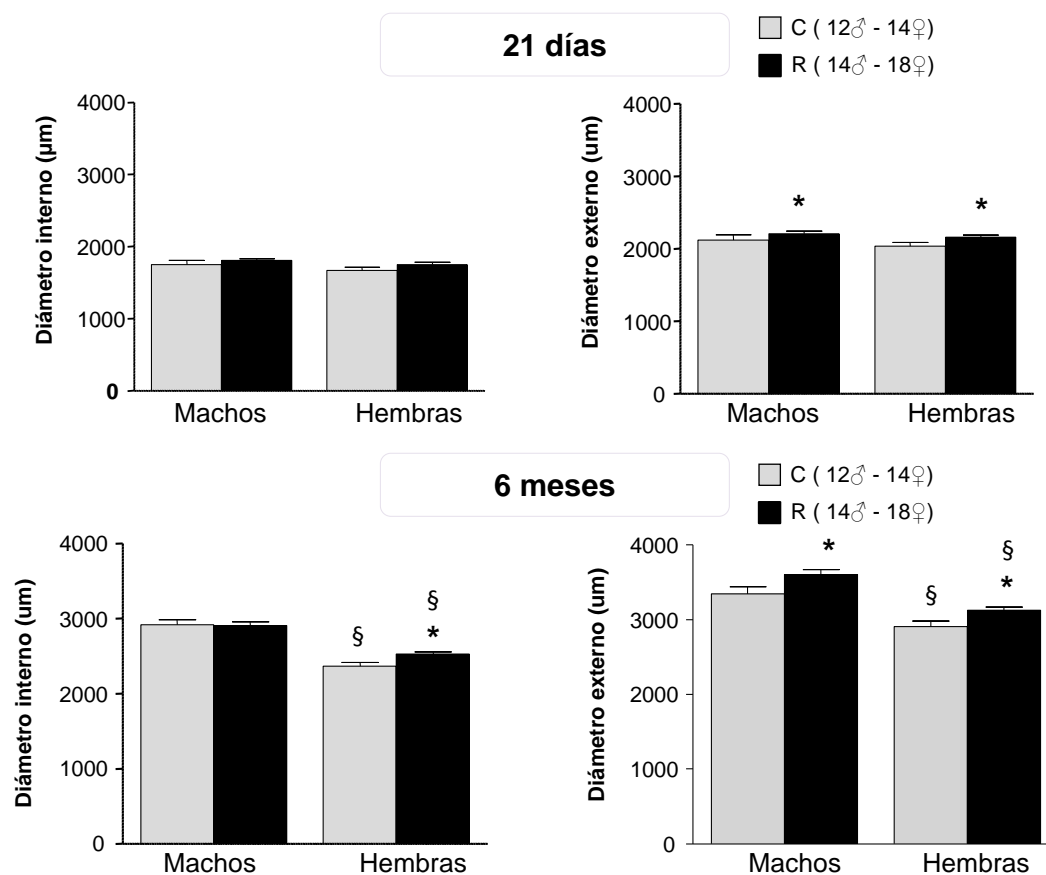
A los 21 días de edad, no se detectan diferencias significativas en el diámetro interno de la aorta de ratas R con respecto a C, tanto en machos como en hembras. Sin embargo, el diámetro externo de la aorta fue significativamente mayor en las ratas R comparado con las ratas C tanto en machos como en hembras, no encontrándose diferencia entre machos R y C (Figura 24)

En ratas de 6 meses de edad, tanto el diámetro interno como el diámetro externo fueron significativamente mayores en ratas hembras R que en hembras C. Los machos R presentan un diámetro externo significativamente mayor pero igual diámetro interno que los C. (Figura 24)

A los 6 meses de edad los diámetros interno y externo de la aorta fueron significativamente menores en las hembras de ambos grupos experimentales con respecto a los machos.

Los diámetros interno y externo de la aorta aumentaron significativamente desde los 21 días hasta los 6 meses de edad en todos los grupos experimentales.

Figura 24. Diámetro interno y diámetro externo de la aorta de ratas de 21 días y 6 meses de edad



C, ratas control; R, ratas sometidas a restricción nutricional. Entre paréntesis el número de animales utilizado; * $p < 0.05$ con respecto al control; § $p < 0.05$ respecto a machos. Los ejemplos representativos se han obtenido mediante microscopia confocal con objetivo x10 y 5x (Em 488nm/Ex 515nm).

Grosor y área de la sección de corte de la capa media

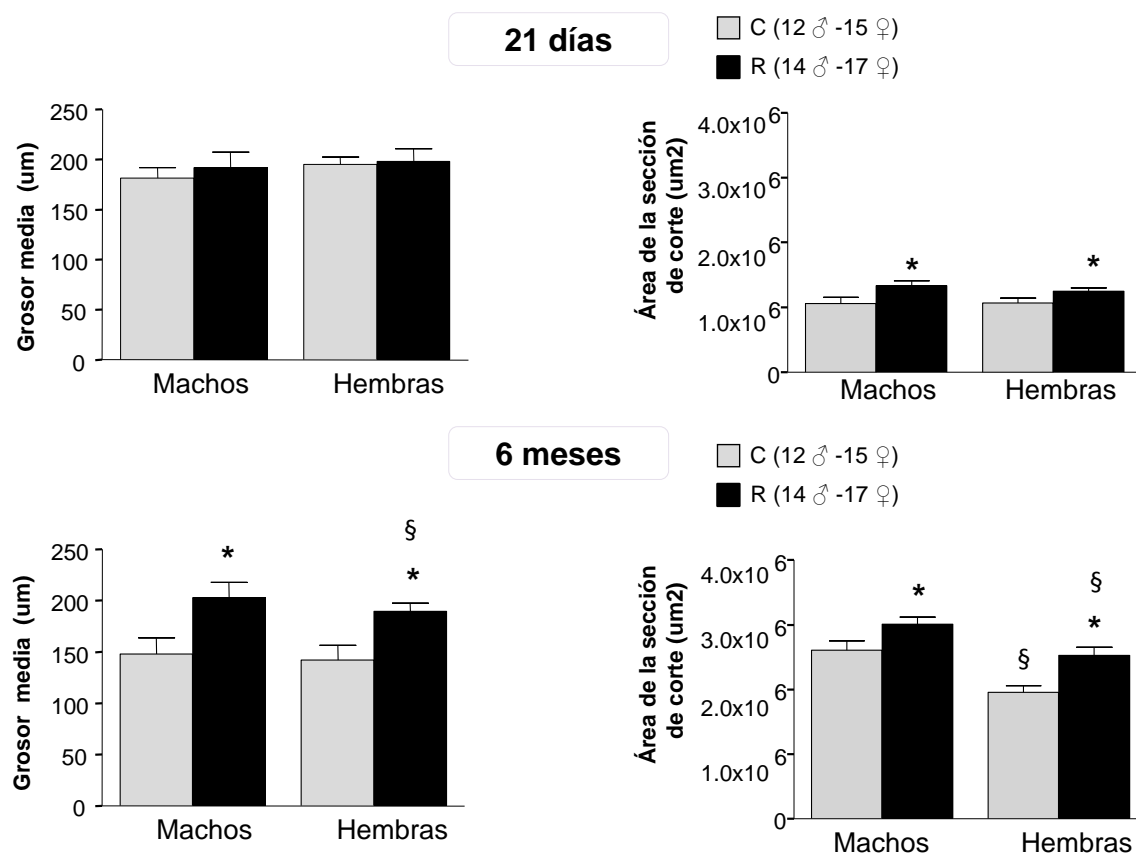
En ratas de 21 días de edad, no se detectaron diferencias significativas en el grosor de la capa media entre ratas C y R, tanto en machos como en hembras. Sin embargo, el área de la sección de corte fue significativamente mayor en las ratas R machos y hembras en comparación con sus respectivos controles. (Figura 25)

En ratas de 6 meses de edad tanto el grosor como el área de la sección de corte de la media fueron significativamente mayores en ratas R, tanto machos como hembras, comparadas con el grupo C. (Figura 25)

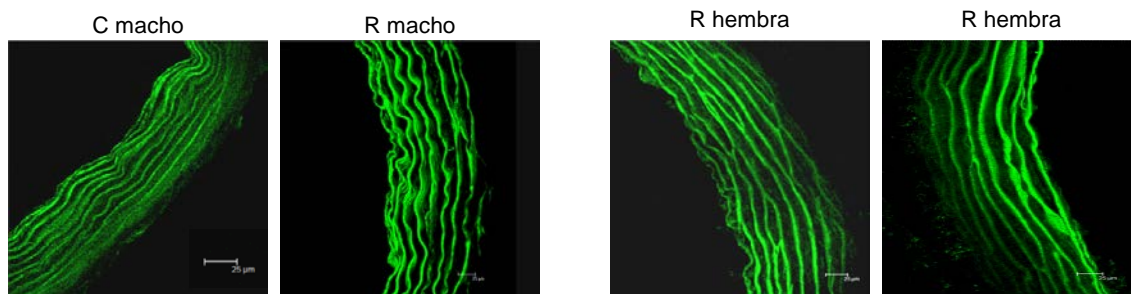
A los 6 meses de edad las hembras presentan una menor área de la sección de corte con respecto a los machos, tanto en las ratas C como en R.

Resultados

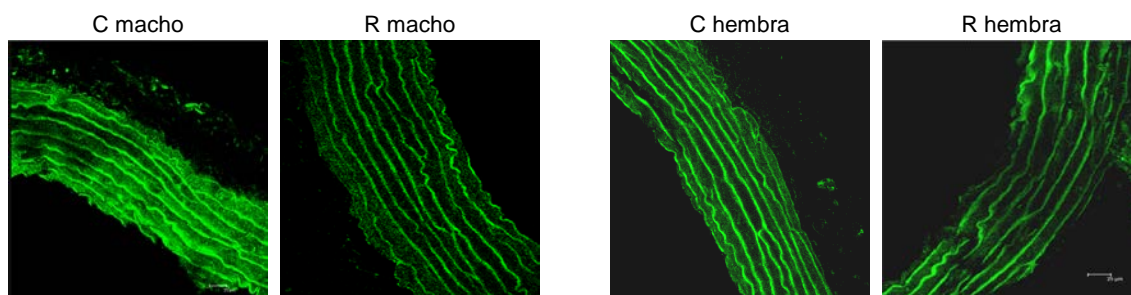
Figura 25. Grosor y área de la sección de corte de la media de la aorta de ratas C y R de 21 días y 6 meses de edad



Aorta de ratas de 21 días



Aorta de ratas de 6 meses



C, ratas control; R, ratas sometidas a restricción nutricional. Entre paréntesis el número de animales utilizado; * $p < 0.05$ con respecto al control; § $p < 0.05$ respecto a machos. Los ejemplos representativos se han obtenido mediante microscopia confocal x40 (Em 488nm/Ex 515nm).

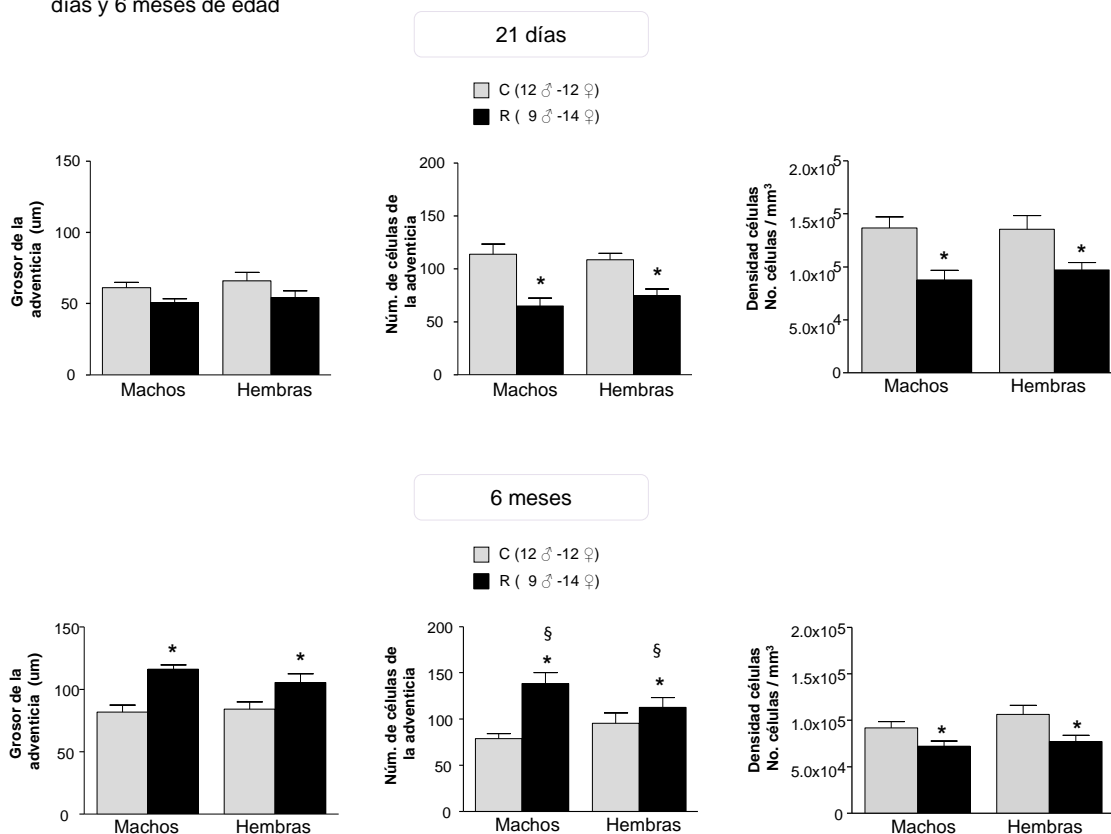
Grosor, número de células y densidad celular de la capa adventicia

En ratas de 21 días de edad no se detectaron diferencias significativas en el grosor de la adventicia entre ratas C y R, ni en machos en hembras. Sin embargo, el número de células de la túnica adventicia de ratas R es significativamente menor respecto a las ratas C, de ambos sexos. Asimismo, la densidad celular en la aorta es significativamente menor de las ratas R respecto a la ratas C, tanto en machos como en hembras. A esta edad no se observaron diferencias significativas entre sexos en ninguno de los grupos experimentales. (Figura 26)

En ratas de 6 meses de edad tanto el grosor como el número de células de la adventicia fueron significativamente mayores en ratas R comparadas con su control, tanto en machos como en hembras. Por el contrario, la densidad celular de la adventicia fue significativamente menor en ratas R en comparación con las ratas C, en ambos sexos. No se observaron diferencias significativas entre machos y hembras en el grosor, número de células ni en la densidad celular de la túnica adventicia en ninguno de los grupos experimentales. (Figura 26)

Resultados

Figura 26. Grosor, número de células y densidad de la capa adventicia de la aorta de ratas C y R de 21 días y 6 meses de edad



C, ratas control; R, ratas sometidas a restricción nutricional. Entre paréntesis el número de animales utilizado; * $p < 0.05$ con respecto al control; § $p < 0.05$ respecto a machos.

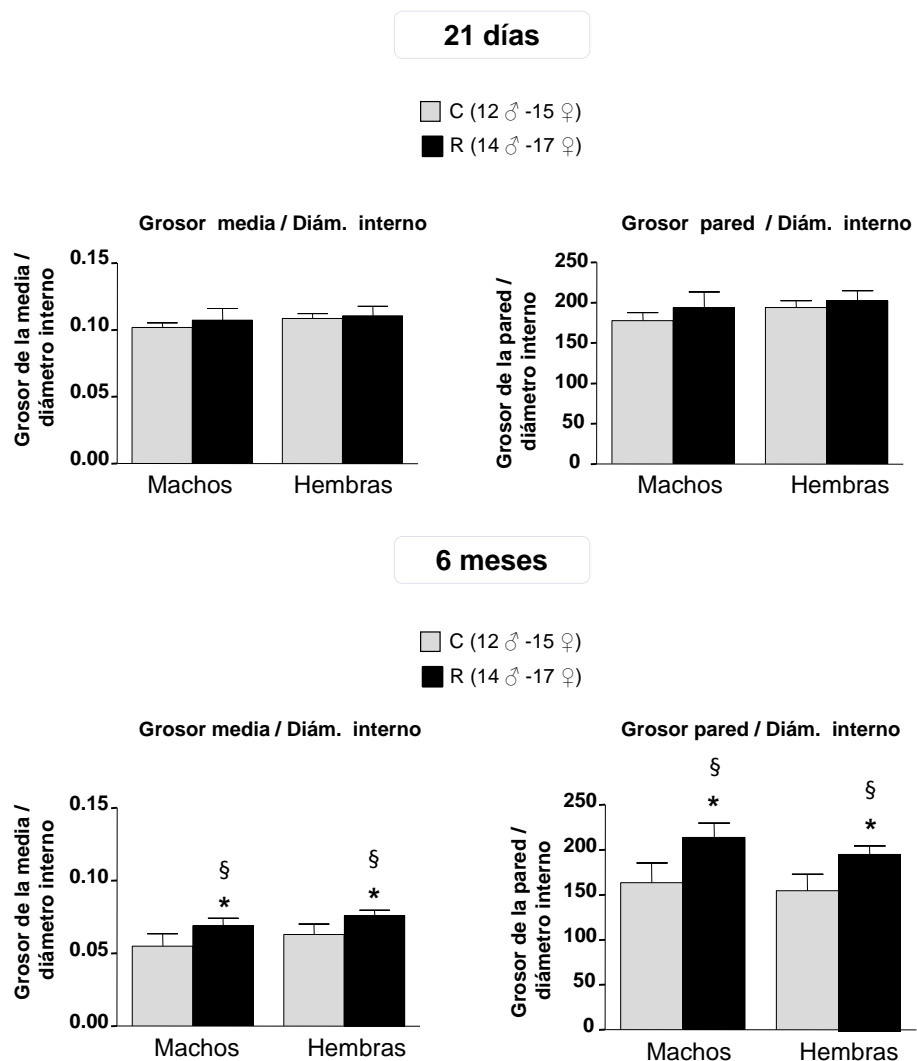
Relación: grosor de la media/diámetro interno y grosor de la pared/diámetro interno.

A los 21 días de edad no se detectaron diferencias significativas entre el grupo C y R en la relación grosor de la media/diámetro interno, ni en la relación grosor de la pared/diámetro interno.

A los 6 meses de edad ambos parámetros fueron significativamente mayores en el grupo R tanto en machos como en hembras en comparación con el grupo C.

La relación grosor de la media/diámetro interno fue significativamente menor en ratas de 6 meses con respecto a ratas de 21 días de edad respecto a todos los grupos experimentales. (Figura 27)

Figura 27. Grosor media/diámetro interno y grosor pared/diámetro interno de la capa media de la aorta de ratas C y R de 21 días y 6 meses de edad



C, ratas control; R, ratas sometidas a restricción nutricional. Entre paréntesis el número de animales utilizado; * $p < 0.05$ con respecto al control; § $p < 0.05$ respecto a machos.

3.2. Propiedades mecánicas

3.2.1. Retracción elástica a los 21 días y a los 6 meses de edad

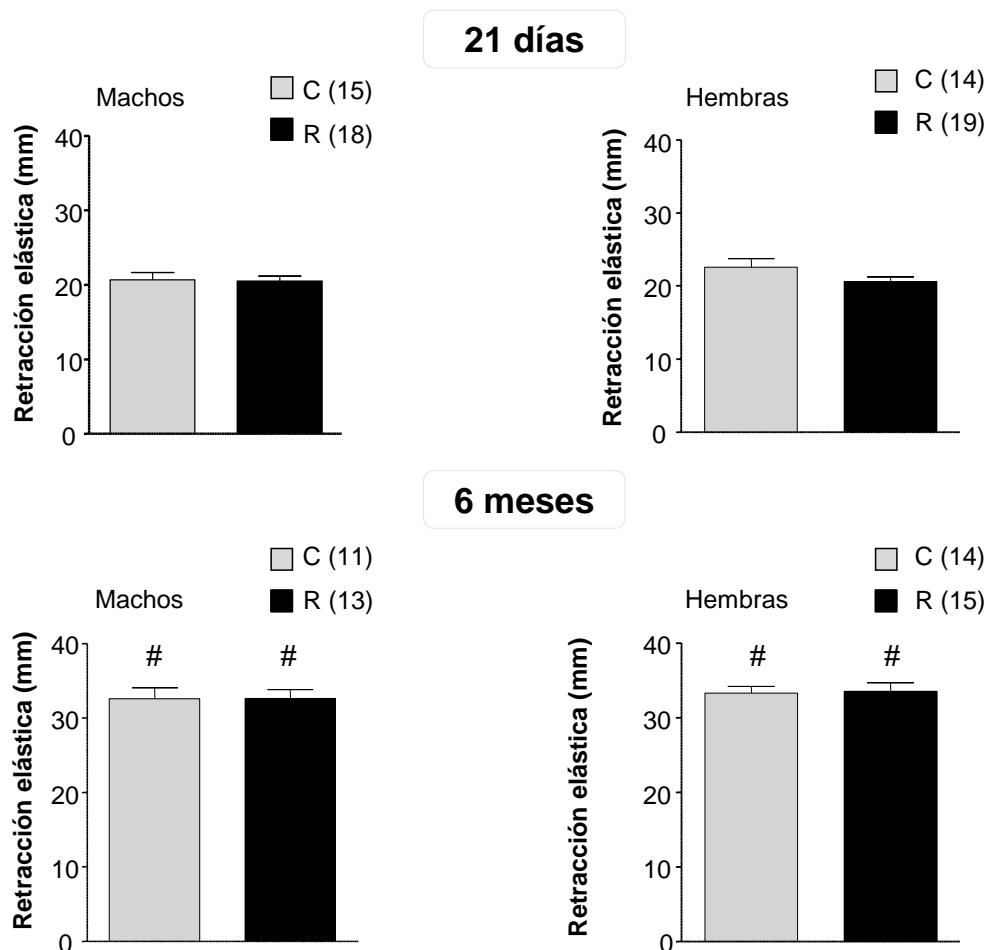
No se detectan diferencias significativas en la retracción elástica de la aorta de ratas de 21 días de edad entre ratas R y C tanto machos como en hembras.

Tampoco se detectan diferencias significativas entre ratas R y C en la retracción elástica de la aorta a los 6 meses de edad, en ninguno de los sexos.

A ambas edades no se encontraron diferencias significativas en la retracción elástica de la aorta entre sexos tanto en las ratas C como en las R.

La retracción elástica de aorta fue significativamente mayor en ratas de 6 meses en comparación con las ratas de 21 días tanto en las ratas R como C y tanto en machos como en hembras. (Figura 28)

Figura 28. Retracción elástica de la aorta en ratas C y R de 21 días y 6 meses de edad



C, ratas control; R, ratas sometidas a restricción nutricional. Entre paréntesis el número de animales utilizado; # $p < 0.05$ con respecto a 21 días de edad.

3.2.2. Curvas tensión-deformación en segmentos de aorta intacta

A los 21 días de edad, las curvas tensión-deformación de segmentos de aorta de ratas R presentan un desplazamiento a la derecha respecto a los de ratas control, tanto en machos como en hembras. Asimismo, el parámetro β - indicativo de la rigidez arterial- fue significativamente menor en ratas R respecto a ratas C, tanto machos como hembras.

A los 6 meses de edad, las ratas R macho presentan un desplazamiento hacia la izquierda de las curvas tensión-deformación y un parámetro β significativamente mayor respecto a las ratas C. Sin embargo, en las hembras

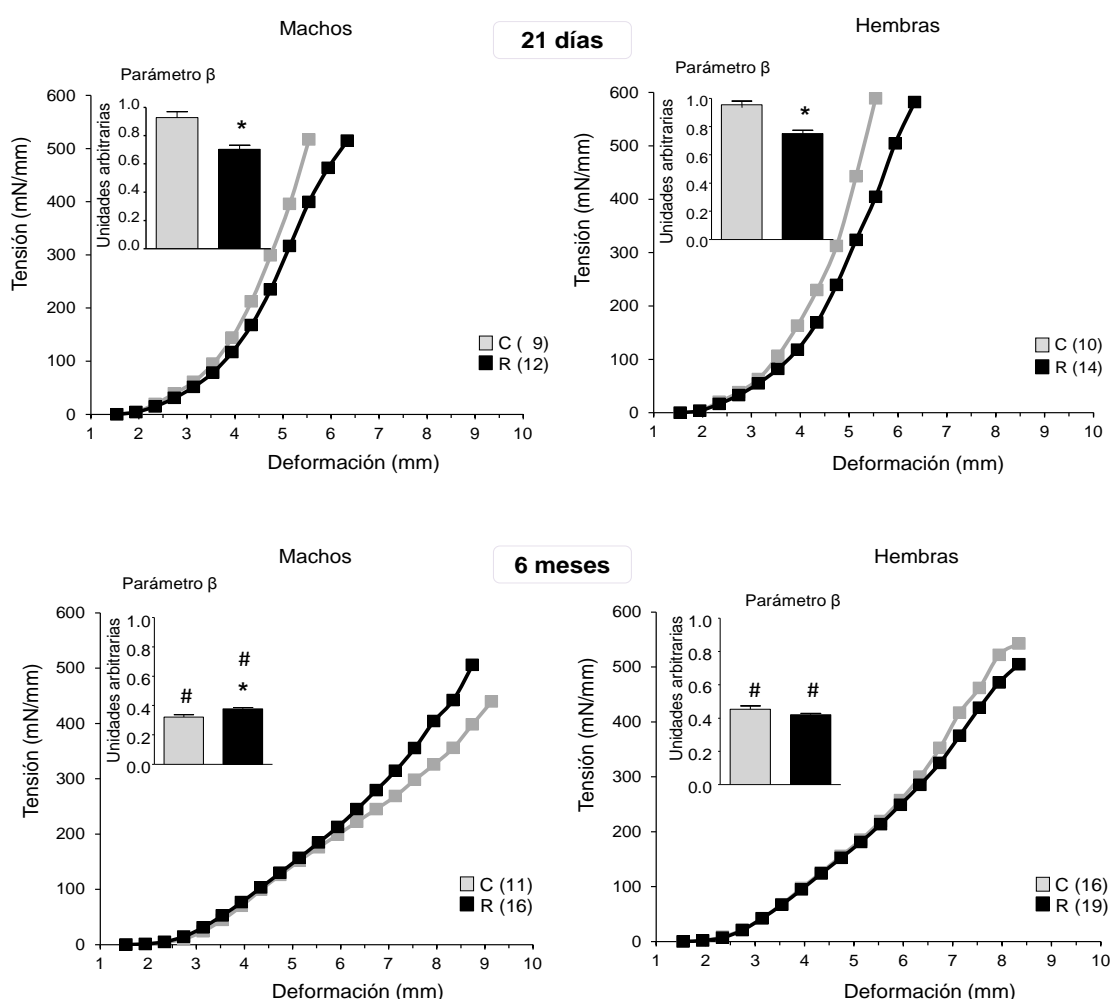
Resultados

R a los 6 meses de edad no presentan modificaciones en las curvas de tensión-deformación y no se detectan diferencias significativas en el parámetro K con respecto a las hembras control.

A los 6 meses de edad, las hembras de ambos grupos experimentales presentaron un valor mayor del parámetro β en comparación con sus respectivos machos.

Por otro lado, el parámetro β fue significativamente menor en aorta de rata de 6 meses de edad, comparado con ratas 21 días en todos los grupos experimentales. (Figura 29)

Figura 29. Curva tensión-deformación y parámetro β en aorta de ratas C y R de 21 días y 6 meses de edad



C, ratas control; R, ratas sometidas a restricción nutricional. Entre paréntesis el número de animales utilizado; * $p < 0.05$ con respecto al control; # $p < 0.05$ con respecto a 21 días de edad.

3.3. Elastina

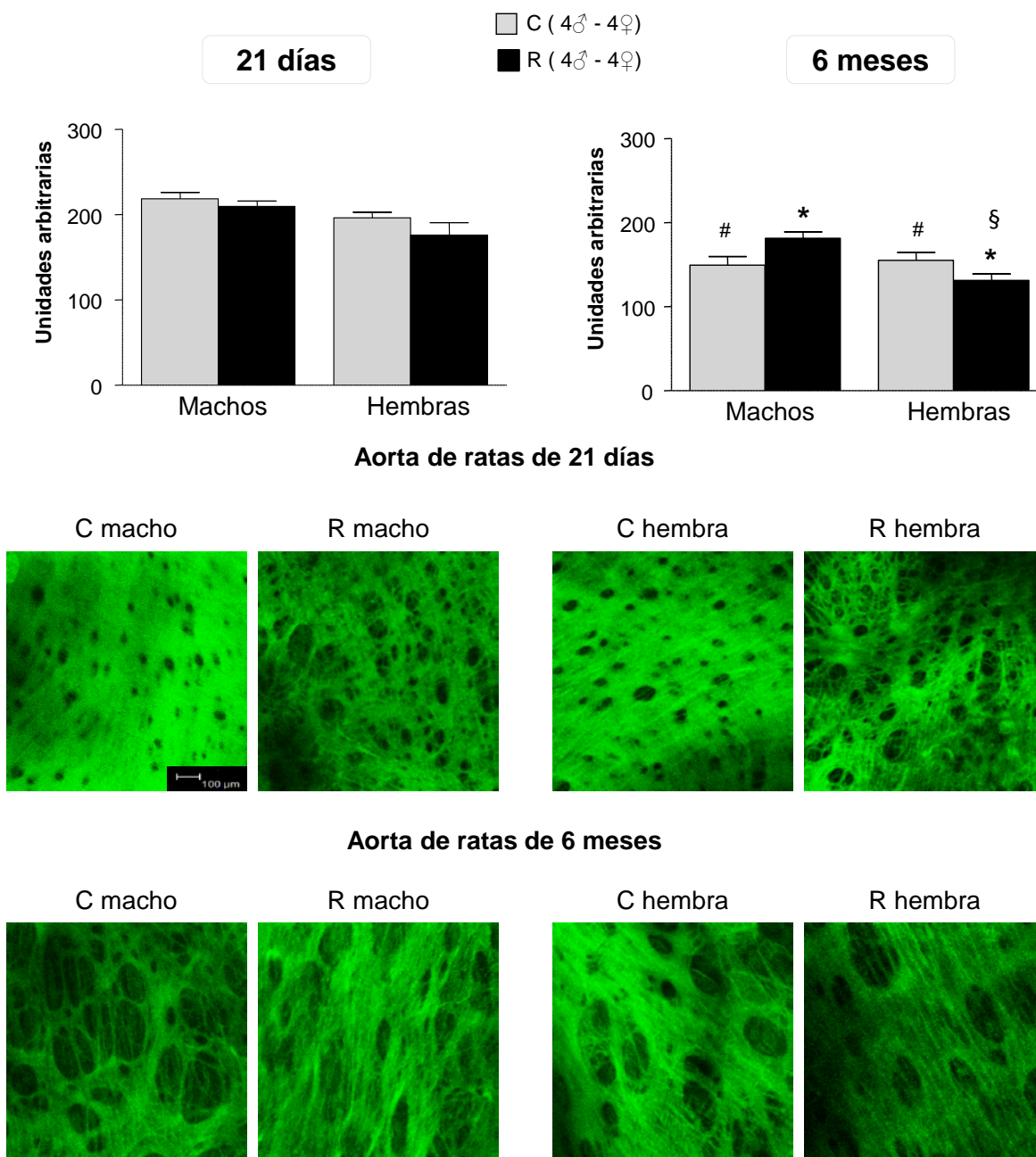
3.3.1. Organización de la elastina en la lámina elástica interna de la aorta

A los 21 días de edad, el área relativa de la lámina elástica interna no se detectaron diferencias significativas entre los grupos R y C, tanto en machos como en hembras.

A los 6 meses de edad, el área relativa de la lámina elástica interna en las ratas R macho fue significativamente mayor respecto al grupo C. Por el contrario, en las ratas R hembras fue significativamente mayor en comparación con las ratas C.

El área relativa de la lámina elástica interna, en las ratas C de 6 meses de edad, son significativamente menores en comparación con las ratas de 21 días de edad de su mismo grupo, tanto machos como hembras. (Figura 30)

Figura 30. Área relativa ocupada por la elastina de la lámina elástica interna arteria aorta



C, ratas control; R, ratas sometidas a restricción nutricional. Entre paréntesis el número de animales utilizado; * $p < 0.05$ con respecto al control; # $p < 0.05$ con respecto a 21 días de edad; § $p < 0.05$ respecto a machos. Imágenes de intensidad de la lamina elástica interna determinada mediante microscopía confocal 20x, zoom8 (Ex 488, Em 515nm).

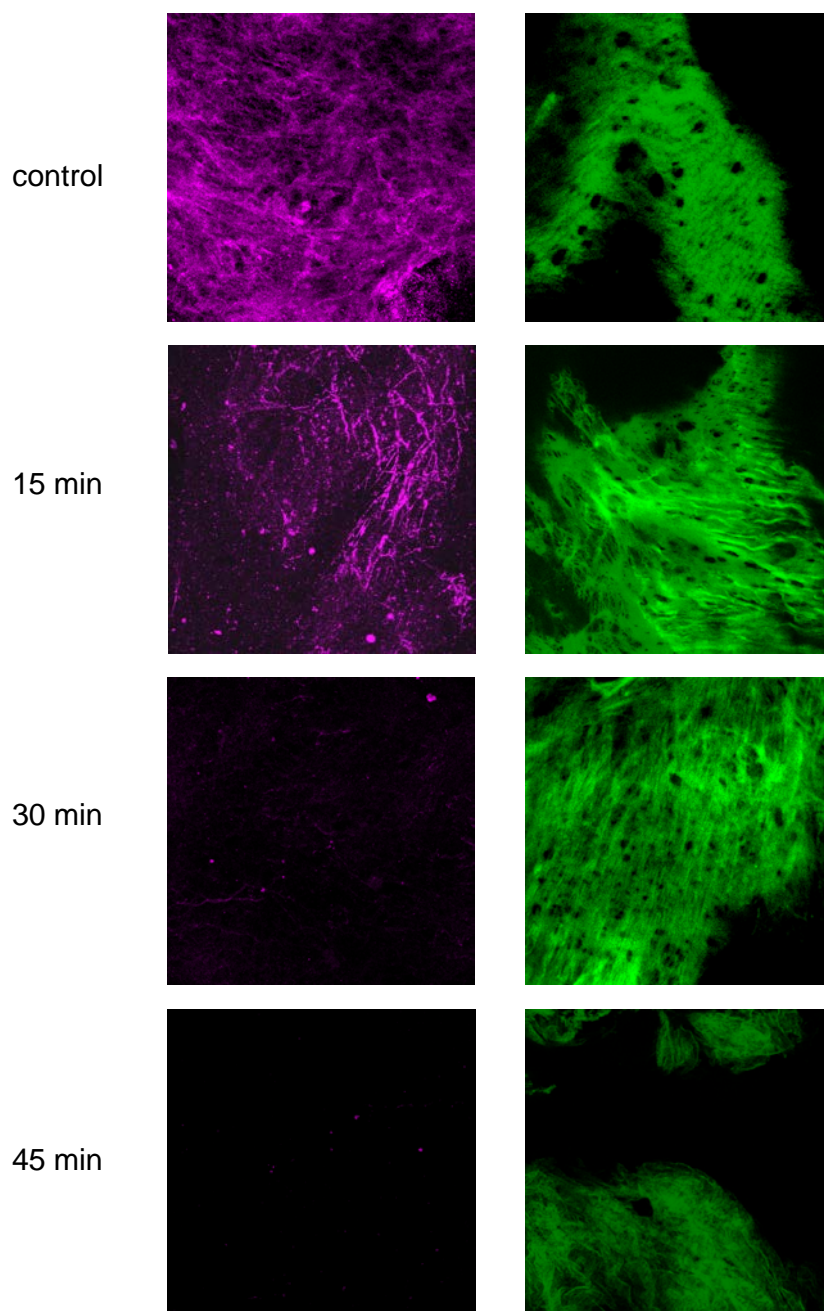
3.3.2. Purificación de la elastina

La purificación de elastina de aorta de ratas jóvenes y adultas se llevó a cabo utilizando distintos tiempos de incubación en álcali a elevada temperatura, para determinar el tiempo óptimo.

En aorta de ratas de 21 días de edad, la incubación durante 15 minutos eliminó completamente las células de la pared vascular, la elastina se mantuvo intacta, tanto la red de fibras de la adventicia como la estructura de la lámina elástica interna, pero se observaron fibras de colágeno en la adventicia. A los 30 minutos, se eliminó completamente el colágeno de la adventicia y se mantuvo la estructura de la elastina. A los 45 minutos y tiempos superiores se observó una degradación de la lámina elástica interna (Figura 31). Estos experimentos permitieron establecer que el tiempo óptimo de purificación de elastina en ratas jóvenes es de 30 minutos.

Experimentos similares se llevaron a cabo en aorta de ratas de 6 meses de edad, estableciéndose que el tiempo óptimo de incubación es de 45 minutos, ya que tiempos inferiores dejan residuos de colágeno y tiempos superiores degradan la elastina (datos no mostrados).

Figura 31. Ejemplo representativo del efecto de distintos tiempos de incubación en 0.1 N NaOH en aorta de rata de 21 días de edad



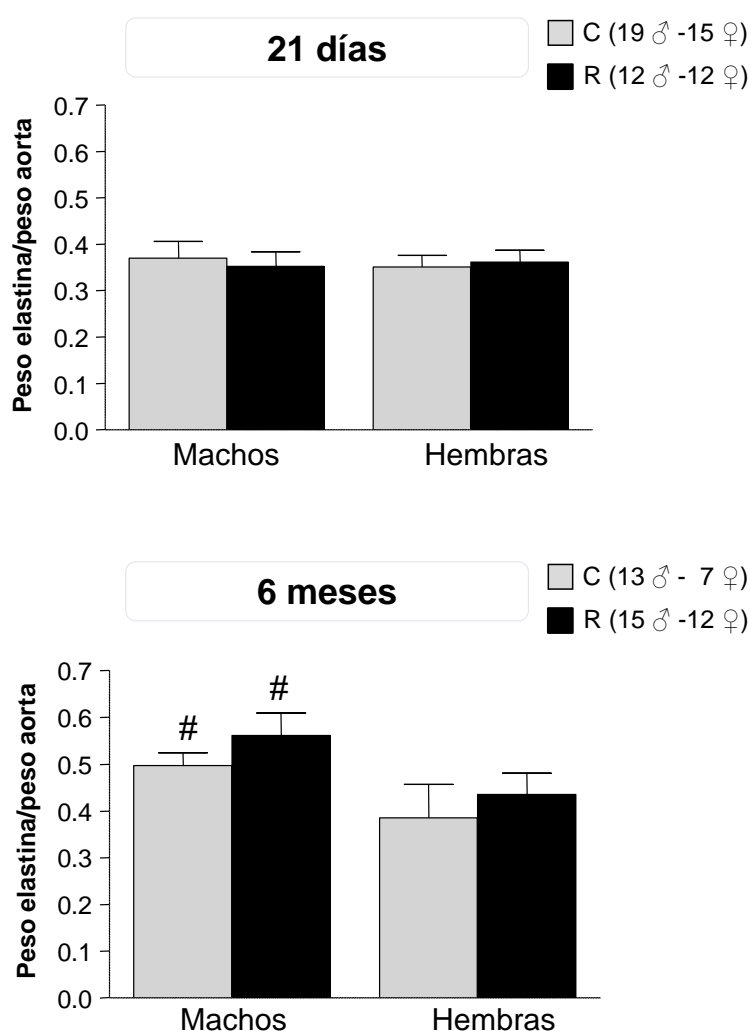
Imágenes representativas del colágeno de la adventicia y la lamina elástica interna en la pared de aorta de ratas de 21 días de edad sometida a distintos tiempos de incubación con NOH para purificación de elastina. Las imágenes se han adquirido mediante microscopio confocal de fluorescencia. La parte izquierda se muestra el colágeno (anticuerpos col I y col. III y secundario Alexa Flúor , Ex 653/Em647nm. La parte de la derecha muestra la lamina elástica interna (Ex 488/Em515nm). Objetivo de x20 zoom 8.

3.3.3. Contenido de elastina en la aorta

En ratas de 21 días de edad no se detectan diferencias significativas en el peso relativo de la elastina de la aorta (peso elastina/peso aorta) entre ratas R y C tanto machos como hembras. Tampoco se detectan diferencias entre ratas R y Control de 6 meses de edad, tanto machos como hembras.

En ratas macho de 6 meses de edad R y C el peso relativo de la elastina es significativamente mayor comparadas con las ratas de 21 días de edad. En ratas hembra no se detectaron diferencias entre ratas jóvenes y adultas. (Figura 32)

Figura 32. Peso relativo de elastina de aorta de ratas de 21 días y 6 meses de edad



C, ratas control; R, ratas sometidas a restricción nutricional. Entre paréntesis el número de animales utilizado; # $p < 0.05$ con respecto a 21 días de edad.

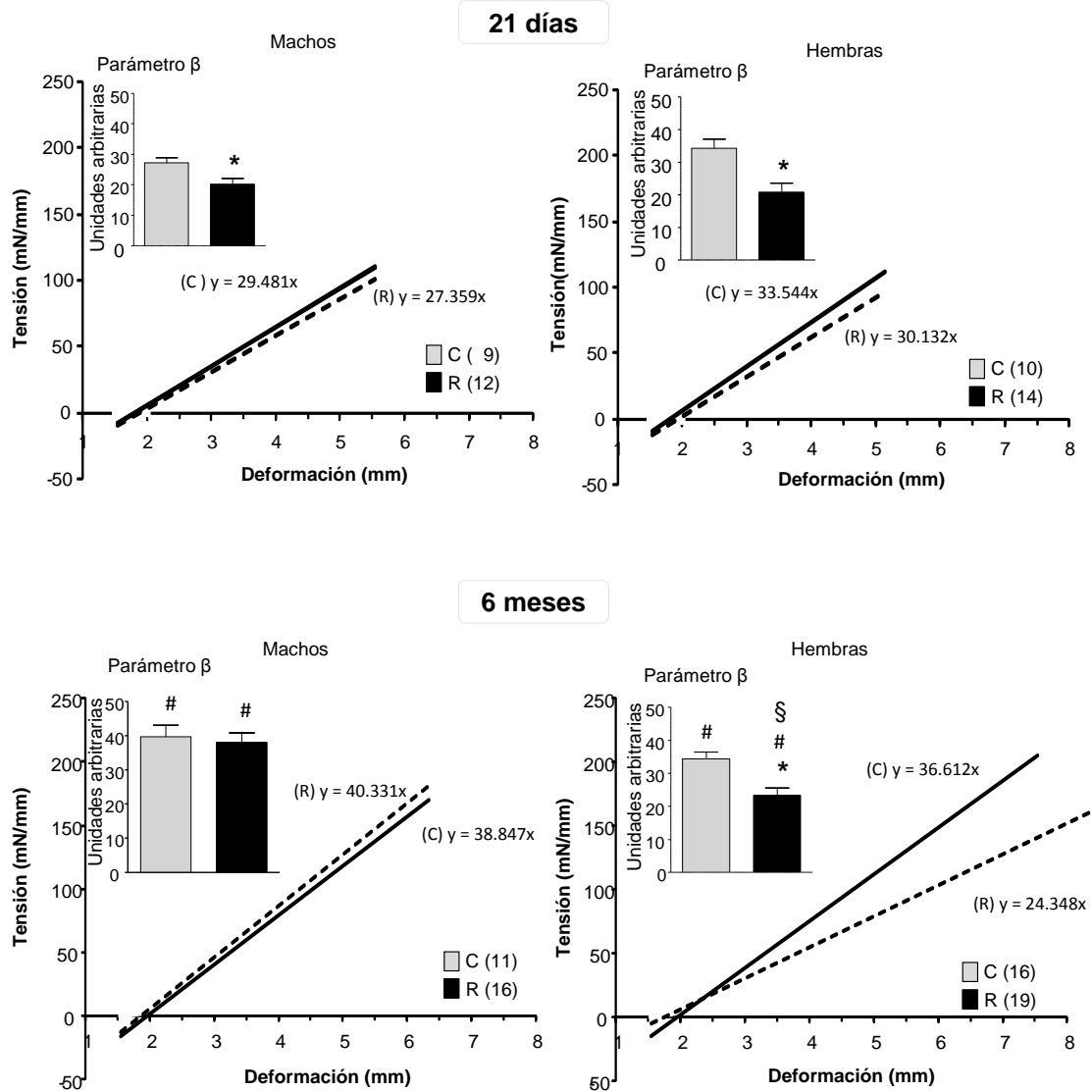
3.3.4. Curvas tensión-deformación de la elastina purificada

La relación tensión-deformación de segmentos de elastina purificada de aorta se ajusta a una recta.

En segmentos de elastina de ratas de 21 días de edad la pendiente de la recta -indicativo de la rigidez vascular- es significativamente menor en ratas R respecto a ratas C, para ambos sexos.

A los 6 meses de edad, la pendiente de la recta es significativamente menor en las hembras R con respecto a su control. Sin embargo, en ratas macho no se detectan diferencias significativas entre R y C. Además, la pendiente de la recta es significativamente mayor en ratas de 6 meses de edad respecto a las de 21 días, en todos los grupos experimentales, excepto en las hembras R y C. (Figura 33)

Figura 33. Relación tensión-deformación en segmentos de elastina purificada de aorta de ratas de 21 días y 6 meses de edad



C, ratas control; R, ratas sometidas a restricción nutricional. Entre paréntesis el número de animales utilizado; * $p < 0.05$ con respecto al control; # $p < 0.05$ con respecto a 21 días de edad; § $p < 0.05$ respecto a machos.

3.4. Colágeno

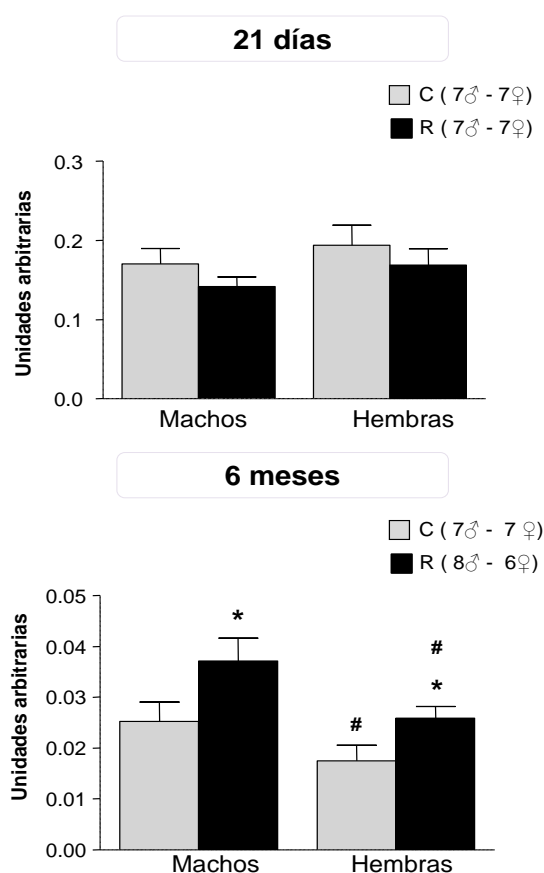
3.4.1. Contenido en colágeno de la aorta

En la aorta de ratas R de 21 días de edad, aunque se observa una tendencia a un menor contenido relativo de colágeno con respecto a la aorta de ratas Control, no se detectan diferencias significativas entre R y C, tanto en machos como en hembras.

En ratas de 6 meses de edad, el contenido relativo de colágeno de la aorta en las ratas R es significativamente mayor en comparación con el grupo C, en ambos sexos.

En ratas hembra y machos de 6 meses de edad de ambos grupos experimentales el contenido relativo de colágeno en la aorta es significativamente menor comparado con las ratas de 21 días de edad. (Figura 34)

Figura 34. Contenido relativo de colágeno en la aorta de ratas C y R de 21 días y 6 meses de edad

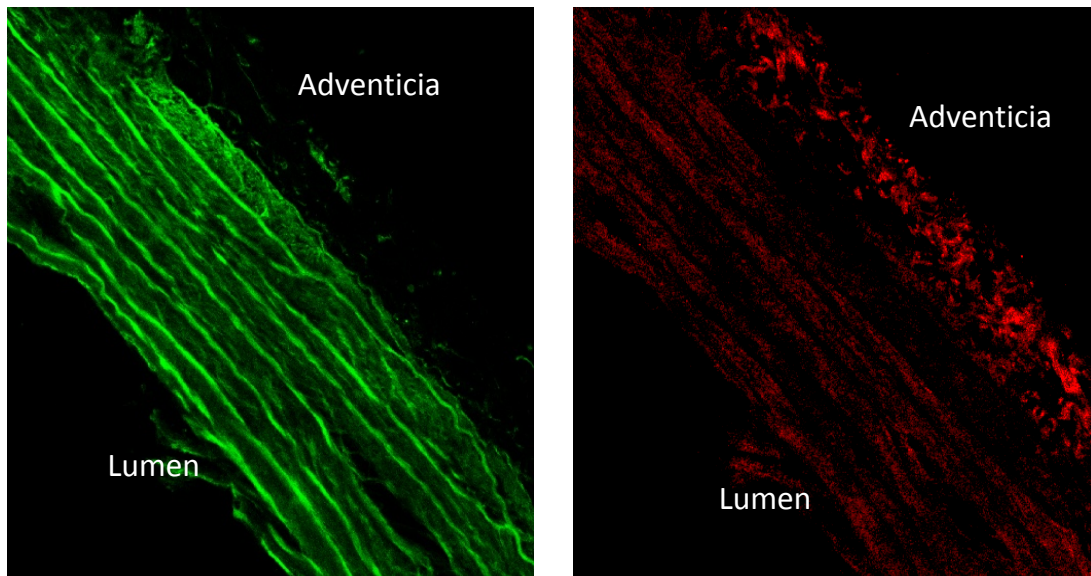


C, ratas control; R, ratas sometidas a restricción nutricional. Entre paréntesis el número de animales utilizado; * $p < 0.05$ con respecto al control; # $p < 0.05$ con respecto a 21 días de edad.

3.4.2. Visualización del colágeno en la aorta

Las imágenes de microscopia confocal y modo reflexión muestran que el colágeno en la aorta se encuentra mayoritariamente en la túnica adventicia, y en menor cantidad entre las lamelas de elastina. (Figura 35)

Figura 35. Imágenes representativas de la distribución del colágeno y la elastina en un anillo de aorta de ratas control de 6 meses de edad.

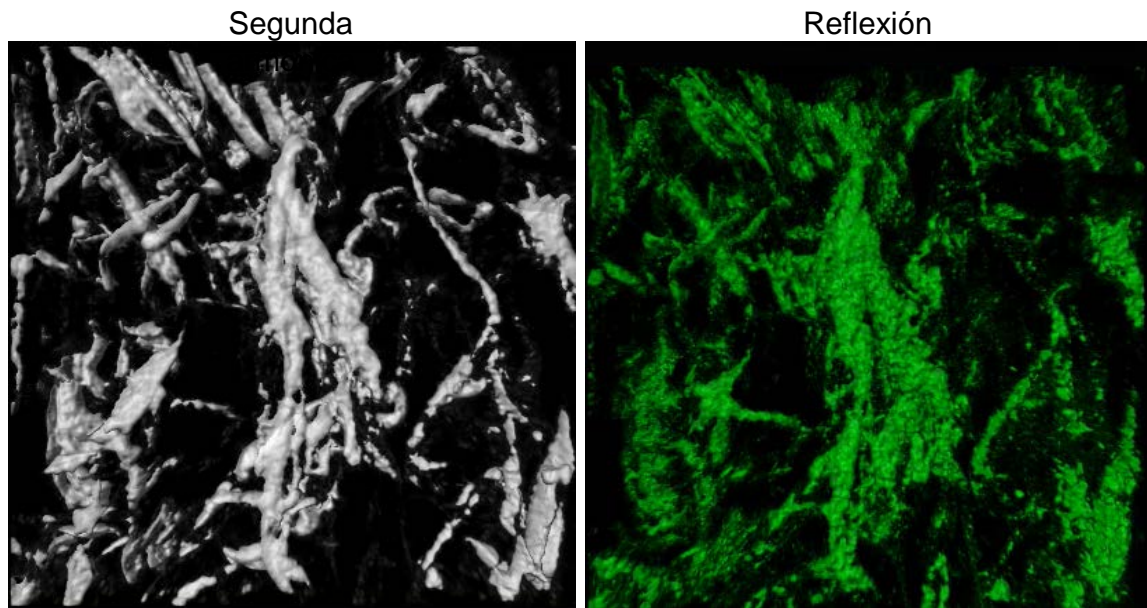


En el panel izquierdo se muestran las lamelas de elastina (autofluorescencia, Ex 488/Em515nm); en el panel derecho se muestra la distribución del colágeno (modo reflexión); objetivo x20 zoom 4

Resultados

Las imágenes de las fibras de colágeno de la adventicia en segmentos de arteria aorta obtenidas mediante el modo reflexión y microscopía confocal son similares a las obtenidas mediante segunda armónica y microscopía multifotón. (Figura 36)

Figura 36. Fibras de colágeno en la adventicia de aorta de rata visualizadas mediante segunda armónica y modo reflexión



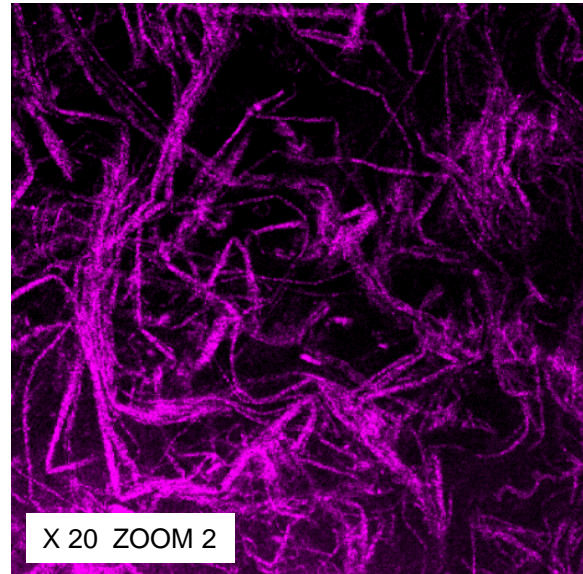
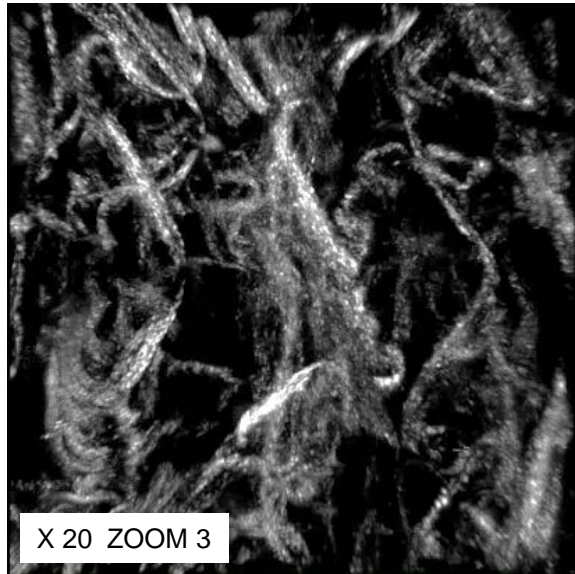
Reconstrucción tridimensional de imágenes seriadas, objetivo x20, zoom 3.

Resultados

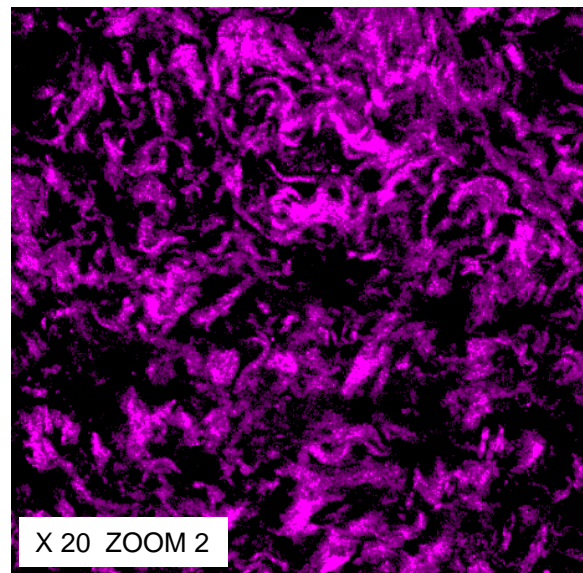
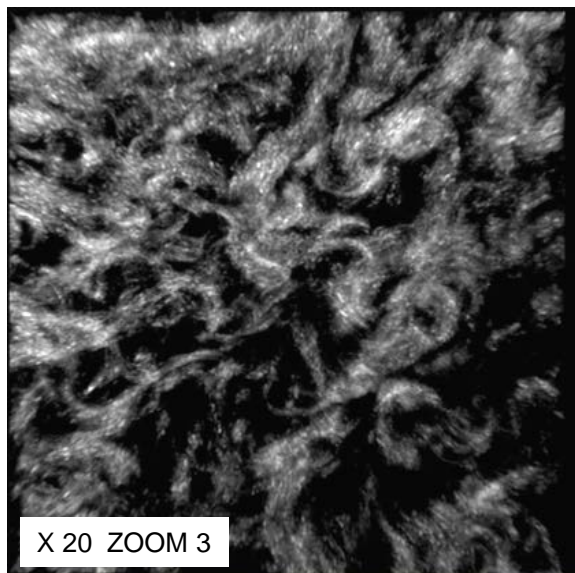
En segmentos de aorta sometidos a estiramiento máximo antes de la rotura, se observa que las fibras más estiradas corresponden a la parte más externa de la adventicia, estando el colágeno más ondulado en las zonas más internas. (Figura 37)

Figura 37. Imágenes representativas de las fibras de colágeno a distintas profundidades de la túnica adventicia

Región externa



Región interna



A la izquierda imágenes obtenidas mediante segunda armónica y microscopía multifotón. A la derecha imágenes obtenidas mediante reflexión y microscopía confocal.

3.4.3. Cuantificación del colágeno de la adventicia

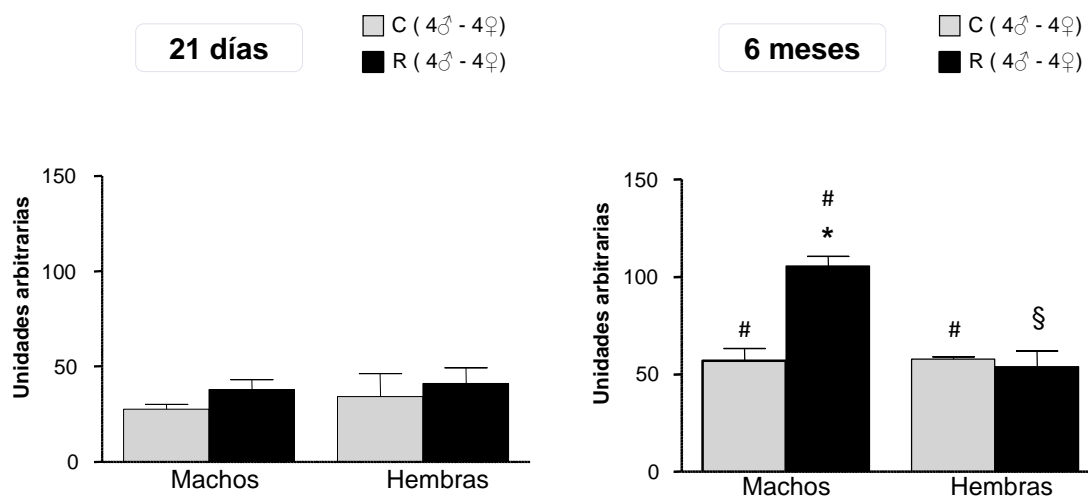
Se utilizó el modo reflexión para cuantificar el colágeno contenido en la región más externa de la túnica adventicia, por ser la zona donde mejor se visualizan las fibras.

En aorta de ratas de 21 días de edad el área relativa ocupada por el colágeno no es significativamente distinta en las ratas R comparadas con ratas C, en ninguno de los sexos.

En aorta de ratas de 6 meses de edad el área relativa de colágeno fue significativamente mayor en ratas R macho en comparación con las ratas C. No se encontraron diferencias entre hembras R y C.

La adventicia de aorta de ratas de 6 meses de edad presenta una cantidad relativa de colágeno mayor que la encontrada en las ratas de 21 días de edad, excepto las ratas R hembras. (Figura 38)

Figura 38. Área relativa ocupada por el colágeno en la región externa de la adventicia de aorta



C, ratas control; R, ratas sometidas a restricción nutricional. Entre paréntesis el número de animales utilizado; * $p < 0.05$ con respecto al control; § $p < 0.05$ respecto a machos.

4. Estudios en arteria mesentérica de resistencia

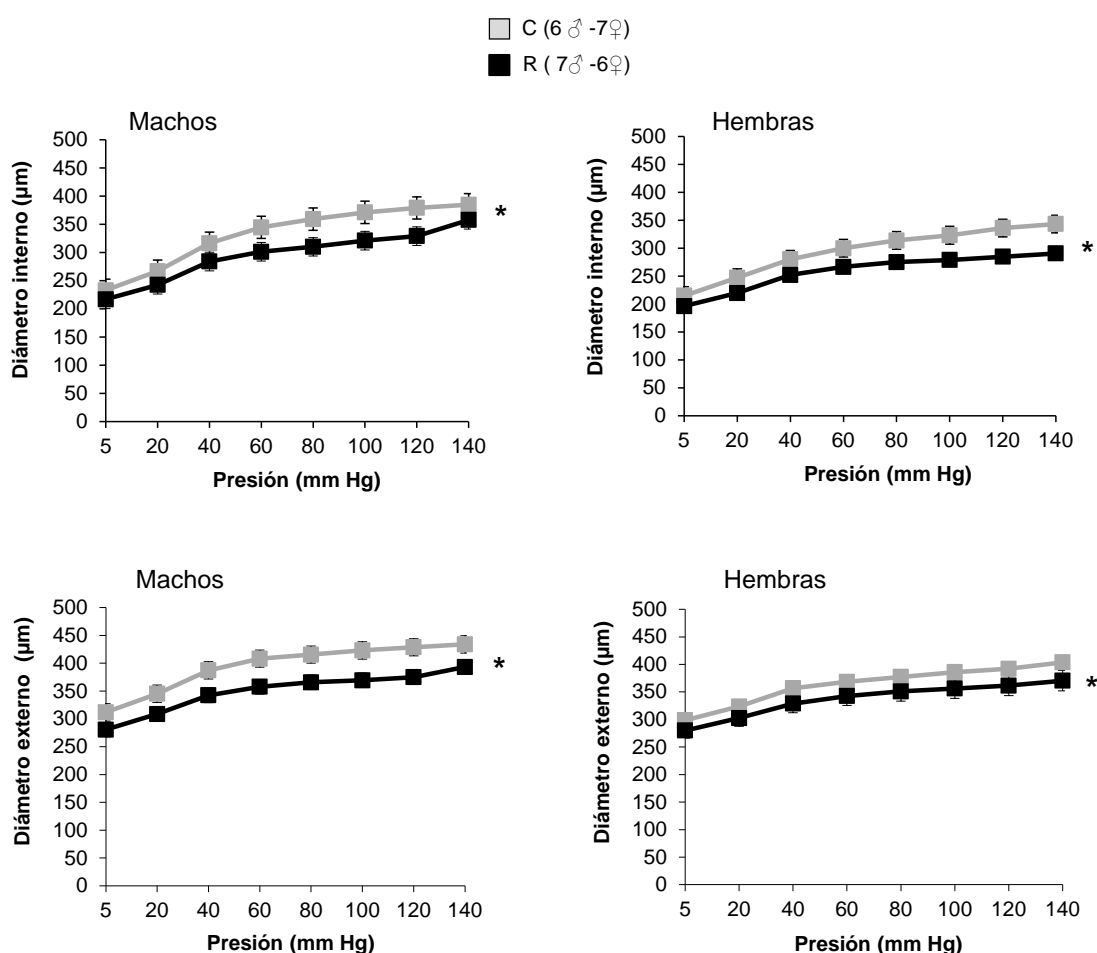
4.1. Estructura

La estructura y la mecánica de las arterias mesentéricas de resistencia (AMR) se estudiaron en ratas de 6 meses de edad.

Diámetros interno y externo

La AMR de las ratas R presenta un diámetro interno y externo significativamente menores en comparación con los de las ratas control, tanto en machos como en hembras, en todo el rango de presiones intraarteriales estudiadas. (Figura 39)

Figura 39. Diámetros interno y externo de la arteria mesentérica de resistencia de ratas R y C de 6 meses de edad



C, ratas control; R, ratas sometidas a restricción nutricional. Entre paréntesis el número de animales utilizado; * $p < 0.05$ con respecto al control.

Área de la sección de corte.

En la AMR el área de la sección de corte no fue significativamente distinta entre ratas R y C, tanto en machos como en hembras. En la tabla 2 se muestran los valores calculados de los datos de la curva presión-diámetro a la presión de 80 mm Hg, como representativos de valores fisiológicos de presión intra-arterial.

Tabla 2. Valores del área de la sección de corte de la arteria mesentérica de resistencia sometida a 80mm Hg en ratas C y R de 6 meses de edad.

	Machos C	Machos R	Hembras C	Hembras R
6 meses	33778±1627 (n=6)	31760±1675 (n=7)	35197±2500 (n=7)	35700±4808 (n=6)

C, ratas control; R, ratas sometidas a restricción nutricional. Entre paréntesis el número de animales utilizado.

Grosor, número y densidad de células de la túnica media

El grosor de la túnica media en la AMR es significativamente mayor en ratas R comparadas con ratas C, tanto en machos como en hembras.

No se encuentran diferencias significativas entre sexos en ninguno de los grupos experimentales.

Respecto al número de células de la túnica media de la AMR, no se detectaron diferencias significativas entre las ratas R y C, tanto machos como hembras. Tampoco se detectaron diferencias entre sexos en los grupos de ratas C y R.

La densidad celular en la túnica media es significativamente menor en machos R respecto a su control; en cambio, no hay diferencias significativas entre hembras R y C. Las hembras presentan una mayor densidad celular que los machos en ambos grupos experimentales. (Figura 40)

Grosor, número y densidad de células de la túnica adventicia

No se detectan diferencias significativas en el grosor de la túnica adventicia entre ratas R y C, tanto machos como hembras.

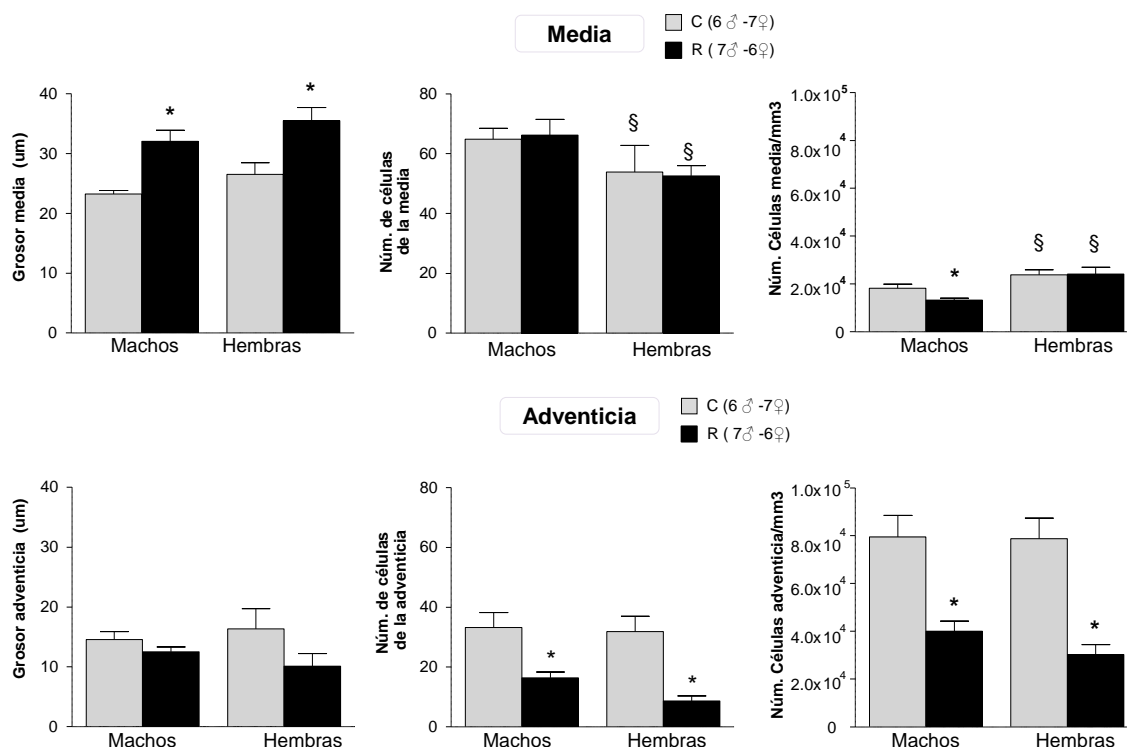
Tanto el número de células de la adventicia como la densidad celular son significativamente menores en ratas R, tanto machos como en hembras, en comparación con el grupo C.

Resultados

Las ratas R hembra presentan un número de células significativamente menor que las ratas R macho.

No se detectaron diferencias significativas en la densidad de células de la adventicia entre machos y hembras de los dos grupos experimentales. (Figura 40)

Figura 40. Grosor, número de células y densidad celular de la túnica media y adventicia de la arteria mesentérica de resistencia de ratas R y C de 6 meses de edad



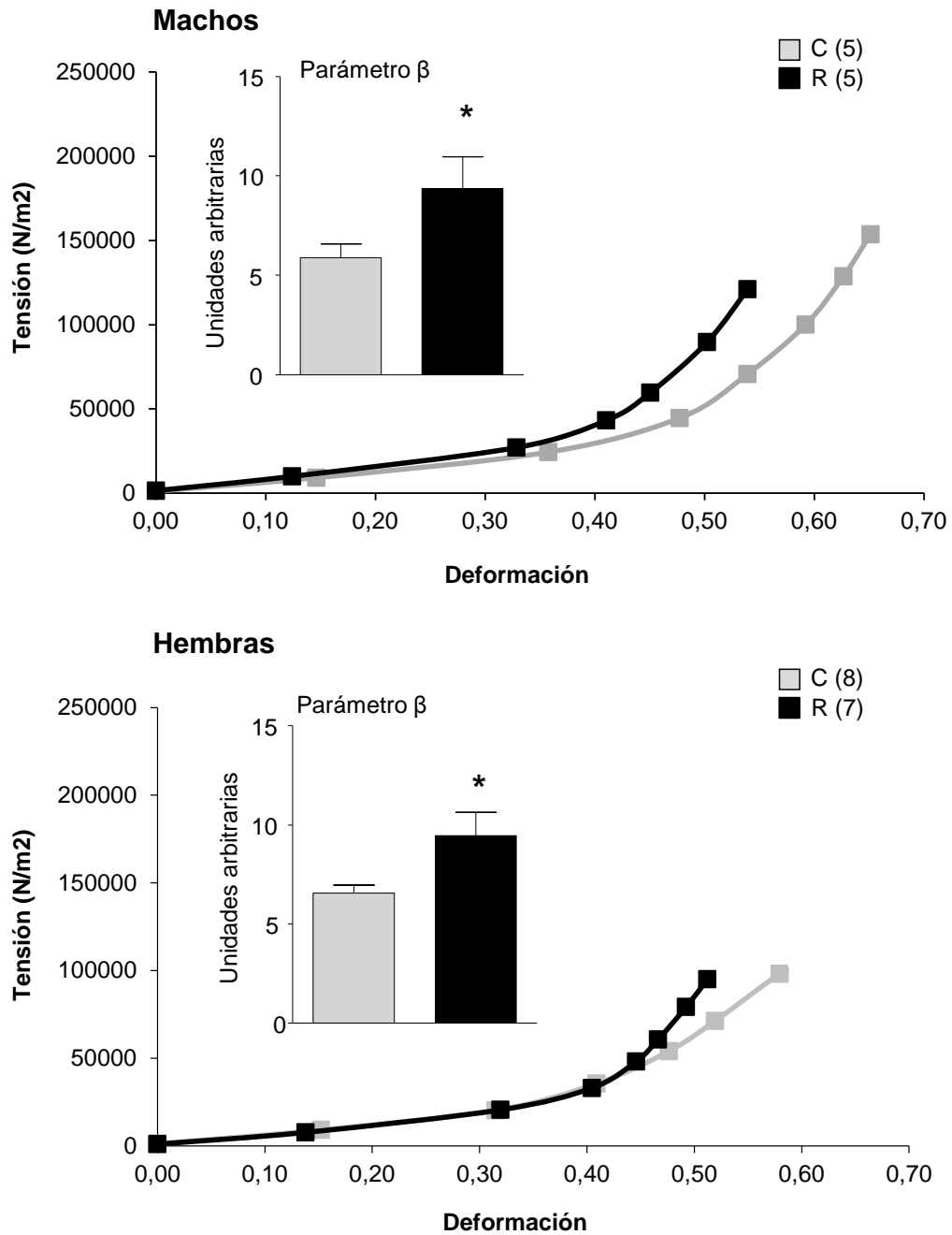
C, ratas control; R, ratas sometidas a restricción nutricional. Entre paréntesis el número de animales utilizado; * p<0.05 con respecto al control; § p<0.05 respecto a machos.

4.2. Propiedades mecánicas

La relación tensión-deformación de segmentos vasculares de AMR de ratas R presenta un desplazamiento a la izquierda respecto a las ratas control, tanto machos como hembras. No se detectan diferencias significativas entre sexos ni el grupo C ni en el R.

El parámetro β correspondiente a las curvas tensión-deformación de la AMR de ratas R es significativamente mayor que en las ratas control, tanto machos como hembras. No se detectan diferencias significativas entre machos y hembras del grupo C ni en ratas R. (Figura 41)

Figura 41. Relación tensión-deformación de segmentos de arteria mesentérica de resistencia de ratas de 6 meses de edad

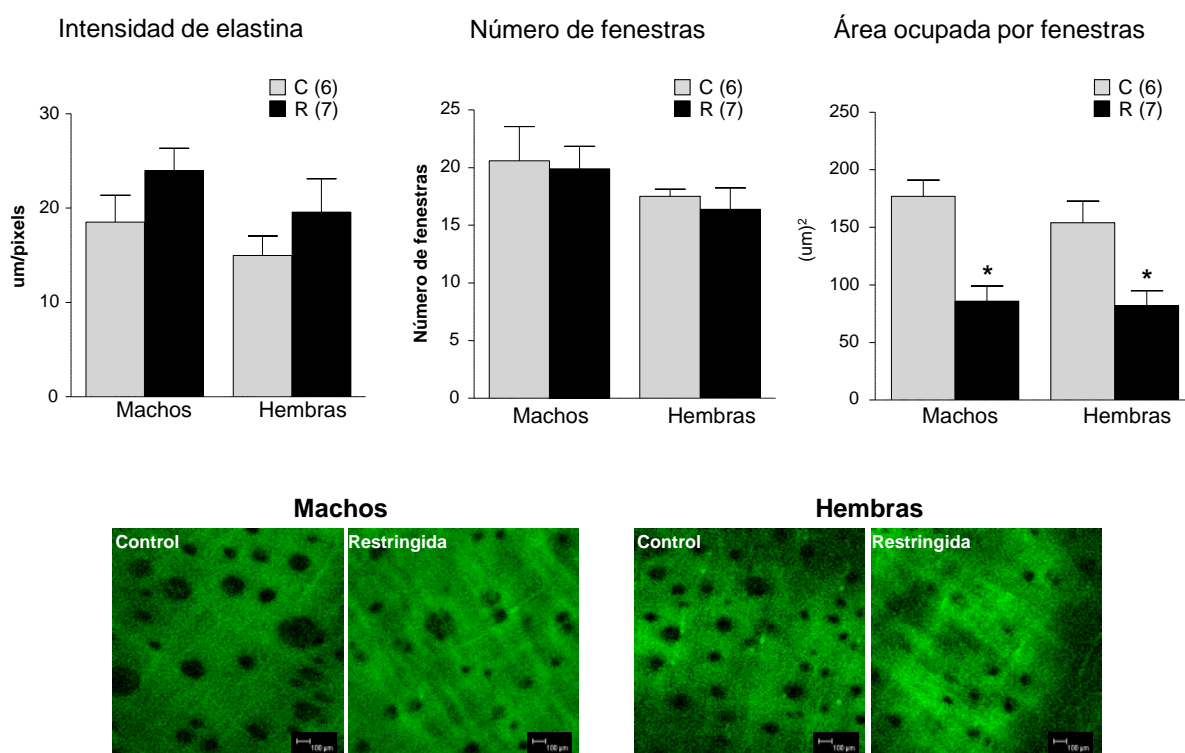


C, ratas control; R, ratas sometidas a restricción nutricional. Entre paréntesis el número de animales utilizado; * $p < 0.05$ con respecto al control.

4.3. Organización de la elastina

En la AMR no se detectaron diferencias significativas en la intensidad de la elastina entre ratas R y C, tanto machos y hembras. Tampoco se observan diferencias en el número de fenestras entre los grupos experimentales de ambos sexos. Sin embargo, en las ratas R el área ocupada por las fenestras es significativamente menor en comparación con las ratas C, tanto machos como hembras. No se observan diferencias significativas entre sexos en ninguno de los grupos experimentales para los tres parámetros estudiados. (Figura 42)

Figura 42. Organización de la lámina elástica interna de arteria mesentérica de resistencia de ratas de 6 meses de edad



C, ratas control; R, ratas sometidas a restricción nutricional. Entre paréntesis el número de animales utilizado ; * $p < 0.05$ con respecto al control.
Ejemplos representativos obtenidos mediante microscopia confocal (40x, zoom 8; Em488nm/Ex 515nm).

Discusión

Se discuten por separado los aspectos técnicos, relativos a los objetivos de validación de nueva metodología y los objetivos relacionados con la programación fetal de la hipertensión.

1. Validación de la metodología utilizada

1.1. Purificación de elastina y determinación de su pureza

La elastina es el componente mayoritario de las fibras elásticas, supone el 90% de la fibra. Aunque procede de un precursor insoluble, la elastina es insoluble, siendo además, extremadamente resistente a la degradación química y capaz de soportar elevadas temperaturas y pH extremos (Arribas et al. 2006). Para llevar a cabo la purificación de la elastina de los tejidos han de ser tenidas en cuenta estas propiedades. Se han descrito numerosos métodos de purificación de elastina, incluyendo el autoclavado, la extracción en álcali y la degradación con CnBr, entre otros, cada uno de ellos con ventajas e inconvenientes (Mecham et al. 2008). En este trabajo se ha utilizado el método de extracción en álcali a elevada temperatura por su sencillez y por el hecho de que, ha sido demostrado que la composición de aminoácidos del producto extraído es la que más se asemeja a la de la elastina nativa (Daamen et al. 2001). Este método, sin embargo, puede conllevar cierto grado de fragmentación de la elastina, por lo que es importante diseñar con cuidado los experimentos para minimizar este problema y, en todo caso, no se recomienda una exposición al álcali superior a 50 min (Mecham et al. 2008). Por este motivo, dado que nuestro objetivo era obtener elastina lo más pura posible, pero viable para analizar sus propiedades mecánicas, se realizaron experimentos de determinación del tiempo óptimo de incubación para arteria aorta de ratas jóvenes y adultas. Consideramos como tiempo óptimo aquel en el que se podía obtener una elastina sin degradación apreciable y sin contaminación con colágeno. Es importante reseñar aquí que el residuo que queda tras dicho tratamiento es elastina y no fibras elásticas, que contienen otros elementos estructurales como fibrilinas, MGAP, fibulina, etc. (Kielty et al. 2002). La incubación con NaOH elimina estas microfibrillas y proteínas asociadas, como demuestra el análisis de aminoácidos (Daamen et al. 2001).

Los experimentos de purificación demostraron que, a tiempos cortos, el componente celular de la aorta es el primero en eliminarse, pero aún se

mantiene parte del colágeno, que requiere tiempos más largos para ser eliminado de forma efectiva. Si el tiempo se excede (más de 30 min para aortas de ratas jóvenes y más de 45min para aorta de ratas adultas) la elastina sufre degradación, como lo demuestra la pérdida de la organización de la lámina elástica interna. La visualización de la lámina elástica se puede tomar como punto de referencia del grado de degradación de elastina, como se ha demostrado con anterioridad utilizando la enzima elastasa (Briones et al. 2003). Para la purificación de la elastina de la aorta se diseñaron dos tipos de protocolos, uno en el que se sometió a la arteria a secado y otro en el que se obvió este paso. El secado de la arteria es importante para determinar de forma fiable el peso relativo de la elastina, evitando interferencias debidas a diferencias en el grado de hidratación. Por otro lado, para poder determinar las propiedades elásticas de la elastina purificada era imprescindible evitar el secado, ya que éste puede dañar la estructura de la elastina por los pasos adicionales de manipulación y por la propia temperatura.

1.2. Cuantificación del colágeno y su organización

Una de las ventajas del método puesto a punto en esta Tesis es el permitir la cuantificación simultánea del componente elástico y del colágeno vascular, de una forma más precisa que la que proporcionan los métodos morfométricos basados en tinciones histológicas. Sin embargo, los estudios histológicos tienen el valor de permitir determinar, no sólo la cantidad sino la localización de una determinada estructura en la pared vascular, lo que puede tener gran importancia.

En histología, el método de detección de colágeno más habitual es la tinción con el colorante rojo sirio, cuya especificidad se basa en su unión a los grupos básicos de la cadena lateral de aminoácidos presentes en el colágeno. Basado en esta especificidad, recientemente, hemos desarrollado un método sencillo basado en la utilización de rojo sirio y dot-blot para la cuantificación de colágeno (Rodríguez-Rodríguez et al. 2015). Este método permite la cuantificación tanto de colágeno intacto y como de colágeno fragmentado, por lo que ha sido el método utilizado en este estudio, ya que el residuo que queda de la purificación de elastina, contiene colágeno degradado por la exposición al NaOH. En este método se utiliza la gelatina (que es colágeno semi-degradado)

para elaborar una recta patrón que permite una cuantificación precisa. Otras ventajas del método son su sencillez, bajo coste y la posibilidad de utilizar muestras muy pequeñas, ya que la cuantificación se relativiza a la cantidad de proteínas totales del residuo, que se cuantifican por el método de Bradford.

El método basado en dot-blot permite una cuantificación global de la cantidad total de colágeno de la pared vascular, pero no de la ubicación ni la organización fibrilar del mismo en la pared vascular. La distribución de las fibras de colágeno, particularmente los colágenos fibrilares I y III, es importante para las propiedades mecánicas arteriales (Wagenseil, Mecham 2009). Por ello, fue de interés evaluar un método que permita la visualización de la orientación, organización y cuantificación de las fibras de colágeno.

La microscopía confocal permite la visualización de estructuras de forma tridimensional mediante la obtención de secciones ópticas finas (de hasta 0.3 micras de espesor) en el eje Z y su posterior reconstrucción tridimensional. Además, por su capacidad de escanear punto a punto la preparación mediante un láser y por su capacidad de recoger la fluorescencia emitida exclusivamente por el plano focal, la microscopia confocal permite una gran resolución, (Inoué 2006). En principio, la microscopía confocal podría ser útil para observar la estructura tridimensional de las fibras de colágeno, su distribución y su grado de estiramiento, mediante el uso de anticuerpos. El problema del uso de anticuerpos puede residir en la presencia de distintos tipos de colágeno, lo que hace necesario el uso combinando de varios anticuerpos, lo que está sujeto a problemas de especificidad e interacciones entre ambos, lo que puede limitar la calidad de la imagen.

La mejor aproximación actual para evaluar la organización fibrilar del colágeno, incluyendo su arquitectura molecular es la utilización de la segunda armónica (Cicchi et al. 2013). Para ello es imprescindible la utilización de un microscopio confocal multifotón que consigue una mejor resolución al permitir la excitación del plano focal con mayor precisión (Denk et al. 1995). A pesar de que la microscopia confocal multifotón es el método de elección para visualizar fibras de colágeno, la principal desventaja es que este tipo de microscopios no están al alcance de todas las instituciones, por su elevado coste. Por ello, uno de los objetivos de esta Tesis ha sido evaluar la posibilidad de utilizar otro método de

visualización y cuantificación de las fibras de colágeno arterial. En concreto se ha evaluado la posibilidad de utilizar la luz reflejada.

La reflexión es una propiedad óptica intrínseca de algunos materiales que poseen un albedo (capacidad de reflejar la luz) elevado, entre los que se encuentran las fibras de colágeno. Si se combina esta propiedad con la microscopía confocal, se pueden obtener imágenes de luz reflejada a lo largo del eje z, que posteriormente pueden ser reconstruidas, permitiendo la visualización de la estructura en 3D. Esta técnica ha sido aplicada con éxito a la visualización de matrices sintéticas basadas en biopolímeros, incluido el colágeno (Brightman et al. 2000), por lo que nos planteamos la posibilidad de visualizar fibras de colágeno nativo en la pared arterial mediante este método.

Las imágenes obtenidas con el modo reflexión fueron muy similares a las adquiridas de la misma región mediante segunda armónica, que es el método de elección para visualizar colágeno fibrilar. Asimismo, la imagen 3D reconstruida, a partir de las secciones ópticas, con ambos métodos también fue muy similar, lo que avala la utilización de la reflexión para visualizar colágeno arterial. Además, las imágenes obtenidas mediante reflexión fueron de calidad suficiente para ser segmentadas, lo que permitió la cuantificación de las fibras de colágeno en la capa adventicia. Hubo una limitación en la profundidad a la que éstas son detectables con calidad, lo que es uno de los problemas conocidos de la microscopía confocal (Inoué 2006). Aunque en el presente trabajo no se ha cuantificado la cantidad de colágeno en la capa media, hemos demostrado la posibilidad de su visualización en anillos de aorta. Todo ello permite concluir que la reflexión puede ser un método alternativo a la segunda armónica para evaluar la disposición y cuantificar colágeno vascular. La utilización de programas potentes de visualización y cuantificación, como el programa Imaris (al que en este estudio sólo tuvimos acceso mediante una demostración) permitirá además evaluar parámetros como el grado de ondulación de las fibras y posibles alteraciones relacionadas en modelos patológicos.

2. Modelo de programación fetal de la hipertensión

Para la realización de esta tesis se eligió un modelo de estrés fetal producido por restricción global de la ingesta durante la segunda mitad de la gestación. Este modelo, al ser menos agresivo que la restricción proteica, se asemeja más a una deficiencia de nutrientes al feto en la población humana, bien por carencias nutricionales en la gestante (países subdesarrollados) o por insuficiencia placentaria (países desarrollados).

Este tipo de restricción de nutrientes en la rata gestante produce una deficiencia en el crecimiento fetal, determinado por el menor peso corporal de las crías R al nacimiento. Sin embargo, a lo largo del periodo de lactancia se produce una aceleración del crecimiento, como demuestra el hecho de que al destete las crías de ratas R alcancen un peso similar al de las ratas control. Este crecimiento acelerado durante la etapa postnatal es un mecanismo compensatorio para equilibrar el retraso del crecimiento intrauterino. Sin embargo, al ser el periodo perinatal un periodo crítico en el desarrollo corporal, se ha sugerido que esta aceleración del crecimiento forma parte de los mecanismos de la programación fetal, contribuyendo al desarrollo de las alteraciones cardiovasculares y metabólicas en la edad adulta. Esto ha sido demostrado tanto en humanos (Singhal et al. 2007) como en distintas especies animales (Tarry-Adkins et al. 2013).

En el modelo experimental utilizado en este estudio hemos demostrado previamente que la ganancia de peso durante la etapa perinatal corresponde a un mayor acúmulo de grasa corporal (Munoz-Valverde et al. 2015), lo que podría contribuir al desarrollo de alteraciones metabólicas en la edad adulta. A pesar de que los animales R alcanzan al destete el mismo peso corporal que las ratas control, la longitud de la tibia, que se toma como parámetro relacionado con la talla, fue menor en las ratas R, manteniéndose en valores inferiores a los de las ratas control hasta la edad adulta. Esto podría estar relacionado con un defecto de la osificación durante el crecimiento, como ha sido constatado en otras especies sometidas a alteraciones nutricionales durante la gestación (Peugnet et al. 2016), incluidos humanos, habiéndose evidenciado una menor densidad ósea en individuos con una pobre nutrición durante la etapa fetal (Krishnamachari, Iyengar 1975).

Por otro lado, la hipertensión es uno de los factores de riesgo cardiovascular que ha sido asociado de forma sistemática a un bajo peso al nacer, tanto en humanos como en modelos animales (Dasinger, Alexander 2016). Algunos estudios epidemiológicos sugieren que hay un dimorfismo sexual en el desarrollo de hipertensión aunque, debido a las diferencias interindividuales y a la heterogeneidad en las edades estudiadas, aún no ha podido ser confirmado en humanos (Dasinger, Alexander 2016). Sin embargo, el dimorfismo sexual en el desarrollo de hipertensión asociada a estrés fetal ha sido constatado en diversos modelos animales, que demuestran que sólo los machos desarrollan hipertensión (Intapad et al. 2014, Nuyt 2008). El modelo de restricción nutricional utilizado en este estudio también desarrolla elevación de la presión arterial, que se manifiesta sólo en machos y en la edad adulta, pero no en edades más tempranas. Algunos estudios demuestran que las hembras sometidas a estrés fetal también pueden desarrollar hipertensión pero con valores de presión más bajos que los encontrados en machos o a edades más tardías (Ozaki et al. 2001, Franco et al. 2007). El presente estudio demuestra que las hembras se mantienen normotensas incluso a edades avanzadas, lo que sugiere que tienen algún mecanismo de protección frente al desarrollo de hipertensión. La diferencia con otros estudios puede ser atribuida a la utilización de modelos más agresivos de desnutrición (por ejemplo, restricción severa de proteínas de la dieta, o a restricción nutricional durante todo el periodo gestacional (Dasinger, Alexander 2016).

3. Alteraciones vasculares asociadas a la programación fetal de la hipertensión

Uno de los principales determinantes de la presión arterial es la complianza arterial, fundamentalmente de la aorta, que permite amortiguar los cambios de presión mediante la modificación de su calibre. La complianza vascular está determinada por la geometría y las propiedades elásticas de la pared; por lo tanto, se ha postulado que una deficiente formación de los vasos sanguíneos durante la etapa intrauterina, por falta de nutrientes, puede ser el mecanismo responsable de la programación fetal de la HTA en humanos. En concreto, se ha postulado que estas alteraciones de la pared vascular pueden ser causadas

por una deficiente síntesis de fibras elásticas, al estar la elastogénesis limitada al periodo fetal y pocos años de la vida postnatal (Martyn, Greenwald 1997b). Esta hipótesis está avalada por la asociación entre un bajo peso al nacer y una elevación de la rigidez arterial en humanos (Montgomery et al., 2000; Cheung et al., 2004). Aunque existen evidencias que constatan alteraciones hemodinámicas en fetos humanos con retraso intrauterino (AL-GHAZALI et al. 1989), esta hipótesis no ha podido ser confirmada en humanos, ya que son necesarios estudios *in vitro*, existiendo muy pocos estudios en animales de experimentación (Khorram et al. 2007).

Otro factor importante que condiciona el valor de la presión arterial es la resistencia vascular periférica, que depende del diámetro de las arterias de pequeño calibre, el cual, a su vez, depende de factores estructurales y funcionales. La mayoría de los estudios acerca del papel de los vasos sanguíneos en la programación fetal de la hipertensión se han centrado en el estudio de las alteraciones funcionales, no existiendo apenas estudios acerca de los cambios estructurales y mecánicos (Nuyt 2008, Poston 2011b). Por esta razón, en el presente trabajo se evalúan las alteraciones estructurales y mecánicas en dos lechos vasculares: la aorta, como arteria principal de conducción y la 3ª rama del lecho mesentérico, como representativa de las arterias de resistencia.

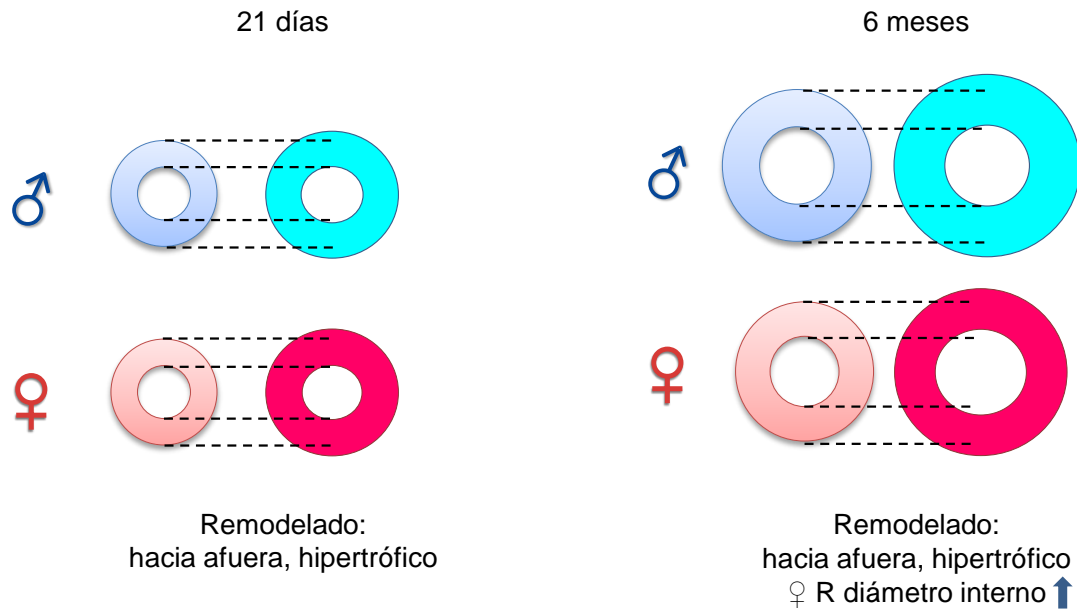
3.1. Alteraciones de la aorta

Estudios llevados a cabo en humanos con bajo peso al nacer han constatado diversas alteraciones en las arterias de conducción, incluyendo un aumento de la rigidez (Martyn et al. 1995) y del grosor de la pared arterial (Skilton et al. 2005).

Nuestros datos muestran que en las ratas R ya se observan alteraciones estructurales de la aorta en la etapa perinatal. En concreto, se observa un remodelado hipertrófico hacia el exterior; es decir, la pared de la aorta se expande sin modificar su diámetro interno y, como consecuencia, aumenta el área de la sección de corte. A esta edad los cambios que se producen son similares en machos y en hembras; sin embargo, este remodelado temprano de la aorta en las ratas R evoluciona hasta la edad adulta de forma diferente en ambos sexos. La principal diferencia reside en que, desde los 21 días hasta los

6 meses de edad, las hembras R desarrollan una mayor expansión del diámetro interno que las hembras control, mientras que en los machos el crecimiento del vaso es similar en ambos grupos experimentales (Figura 43).

Figura 43. Resumen alteraciones estructurales en la aorta



Esta diferencia podría ser atribuida a las hormonas sexuales, como han sugerido algunos autores (Ojeda et al. 2007b, Ojeda et al. 2007a). Los estrógenos aumentan la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO) como consecuencia de un aumento en la expresión de la NO-sintasa y de una disminución en la producción mitocondrial de ROS (Pierdominici et al. 2011). El NO es un potente vasodilatador, por lo que un aumento sostenido del mismo puede conducir a la elevación del flujo sanguíneo y como consecuencia, a un aumento de la fuerza de rozamiento. Es conocido que una elevación del rozamiento, es uno de los estímulos hemodinámicos que producen un aumento de la luz vascular (Pourageaud, De Mey 1997).

En nuestras condiciones experimentales no fue posible cuantificar si el remodelado afectaba a cambios en el número de CML, ya que la arteria aorta es muy gruesa y el láser no penetra lo suficiente para poder visualizar toda la túnica media mediante microscopía confocal. Por ello, no podemos concluir si la hipertrofia de la media se debe a hiperplasia de las células musculares lisas, hipertrofia de las mismas, o bien a un aumento de la matriz extracelular;

también podría deberse a ambos componentes, celular y extracelular. Sugerimos que el componente celular no está modificado, siendo el componente extracelular el que probablemente está incrementado ya que, experimentos preliminares para analizar la capacidad contráctil indicaron que la respuesta de segmentos vasculares de aorta a KCl -un vasoconstrictor inespecífico- no fue distinta en ratas R y C. Además, esta sugerencia se encuentra apoyada por el mayor contenido en colágeno de la aorta de ratas R, tanto a los 21 días como a los 6 meses de edad.

El contenido relativo de células y MEC sí pudo ser cuantificado en la túnica adventicia de la aorta, demostrándose una menor densidad celular y un mayor contenido de colágeno en la aorta de ratas R. Aunque no hemos determinado el tipo de células, en principio, lo que hay en la adventicia son fibroblastos. Nuestros datos demuestran que, desde el destete hasta la edad adulta los fibroblastos proliferan más en la aorta de las ratas R. Sin embargo, este aumento no se traduce en una mayor densidad celular, lo que significa que estos fibroblastos están produciendo mayor cantidad de matriz extracelular fibrosa. Es bien conocido que la elevación en la concentración de Ang II o alteraciones en sus receptores son uno de los mecanismos responsables de la fibrosis asociada a la HTA, a través de un incremento en la expresión de NADPH oxidasa y de producción de ROS (Sinha, Kumar Dabla 2015). Sugerimos que el remodelado vascular observado en este modelo experimental puede estar asociado con estos fenómenos. Por un lado, se ha descrito que en machos sometidos a desnutrición fetal se producen alteraciones en el sistema renina-angiotensina y estrés oxidativo, asociados a una elevación de testosterona (Ojeda et al. 2012). La posible implicación del estrés oxidativo en nuestro modelo experimental, está apoyada por la elevación en el daño oxidativo previamente descrito en plasma de ratas R macho (Rodríguez-Rodríguez et al. 2015).

Los datos estructurales indican que la aorta de ratas sometidas a restricción nutricional en la etapa fetal presenta un remodelado asociado a fenómenos de fibrosis. Puesto que éstos están muy relacionados con alteraciones de las propiedades mecánicas de la pared, en el presente trabajo se estudió el comportamiento mecánico de la aorta analizando su capacidad de deformación frente a la tensión.

Los vasos sanguíneos se encuentran sometidos a varios tipos de tensiones; la debida a la sujeción a los tejidos circundantes en sentido longitudinal y las relacionadas con factores hemodinámicos –flujo y presión- que originan una tensión de rozamiento y una tensión circunferencial, respectivamente. Mediante estudios *in vitro* es posible analizar las alteraciones en la deformabilidad arterial, es decir en las propiedades mecánicas de la pared. En este estudio se han analizado las posibles alteraciones en la deformabilidad en sentido longitudinal y radial, determinando la retracción elástica y los cambios de diámetro en segmentos sometidos a tensión radial, respectivamente.

La retracción elástica en la aorta de ratas de 21 días fue aproximadamente del 25%, aumentando al 35% a los 6 meses de edad, sin encontrarse diferencias entre los animales sometidos a restricción nutricional y los animales control, a ninguna de las edades. Estos datos son similares a los descritos en condiciones normales en otras especies (Jackson et al. 2002), lo que parece indicar que la desnutrición fetal no afecta a la distensibilidad en sentido longitudinal. Se ha demostrado que la deformación arterial en este sentido se atribuye a la tensión originada por el tejido circundante al que está unida la arteria y no está determinada por factores hemodinámicos (Jackson et al. 2002). El hecho de que la retracción elástica de la aorta sea mayor en las ratas adultas que en las jóvenes sugiere un crecimiento mayor de las estructuras que rodean y mantienen fija la aorta que el crecimiento de la propia arteria, de manera que en la edad adulta la arteria aorta está sometida a una mayor tensión longitudinal, es decir, más estirada.

En cuanto a la deformabilidad de la aorta en sentido radial, de la que depende la capacidad de amortiguación del flujo pulsátil del corazón y su transformación en un flujo continuo, si se observaron alteraciones en las ratas sometidas a restricción nutricional. A edad temprana, las ratas R presentan una aorta con mayor grado de elasticidad, como indica el desplazamiento de las curvas de tensión-deformación hacia la derecha y el menor valor del parámetro beta. Este valor es directamente proporcional al módulo elástico de Young (Dobrin 1978) y por lo tanto, un indicador del grado de rigidez de la pared.

Las diferencias de comportamiento mecánico de la aorta de ratas R jóvenes sugieren alteraciones de alguno de los componentes de la pared vascular, inducidas por el ambiente intrauterino adverso. Las propiedades mecánicas de

los vasos están determinadas fundamentalmente por la MEC, fundamentalmente por el colágeno y la elastina (Wagenseil, Mecham 2009), por lo que los cambios en la deformabilidad de la aorta pueden estar determinados por un cambio cuantitativo en alguna de estas dos proteínas, o bien deberse a alteraciones en su organización.

A los 21 días de edad no se detectaron alteraciones en la cantidad de colágeno en las ratas R, ni en el colágeno total de la pared ni en el colágeno presente en la adventicia. A esta edad el modelo experimental de programación fetal utilizado en este estudio aun no presenta elevación de la presión arterial, por lo que sugerimos que la desnutrición fetal no causa alteraciones tempranas en el colágeno. En modelos similares de programación fetal inducida por desnutrición se ha evidenciado disminución de colágeno al nacimiento y elevación a los 2 meses de edad, cuando las ratas ya son hipertensas (Khorram et al. 2007). Por otro lado, en modelos animales de hipertensión espontánea (rata SHR) también se ha demostrado que el aumento de la deposición de colágeno en las arterias de conducción se debe a la elevación de la presión arterial (van Gorp et al. 2000). Por todo ello concluimos que las diferencias en el comportamiento elástico de la aorta de ratas R de 21 días de edad no parece ser atribuible a alteraciones en la cantidad de colágeno vascular.

Se analizaron las posibles modificaciones en la elastina, el otro componente mayoritario de la MEC, tanto en sus propiedades mecánicas como en su composición y organización. Se observó que la elastina purificada de la aorta de las ratas R jóvenes era más deformable que la de las ratas control, como demuestra la menor pendiente de la recta tensión-deformación y menores valores del parámetro β . La cantidad de elastina, detectada tanto por peso relativo, como mediante morfometría en las imágenes de la lámina elástica interna, no estaba modificada en ratas R.

La visualización y cuantificación de la elastina mediante microscopía confocal por sus propiedades de autofluorescencia, ha sido ampliamente validada por nuestro grupo de investigación en arterias de conducción y de resistencia (Briones et al. 2003, González et al. 2005a, Arribas et al. 2008). En la lámina elástica interna de la arteria aorta no fue posible cuantificar de forma fiable el tamaño de las fenestras debido a la presencia de material elástico más fino en

su interior, lo que hace necesaria una medida manual, que puede ocasionar errores importantes. Sin embargo, en las imágenes de microscopía confocal se detectaron diferencias cualitativas, observándose que en la aorta de ratas R la lámina parece menos compacta y con fenestras de mayor tamaño, pero con presencia de elastina en su interior. Por tanto sugerimos que aunque la cantidad de elastina es similar en ratas R y C, su distribución es diferente, lo que puede estar relacionado con las diferencias observadas en su comportamiento mecánico. La importancia de la distribución de la elastina en las lamelas elásticas, frente a la cantidad total ha sido previamente demostrado en aorta de ratas SHR de 1 mes (Arribas et al. 2008). Sugerimos que estas diferencias en la organización de la lámina elástica en ratas de 21 días pueden deberse a alteraciones en el proceso de deposición-degradación en la elastina. Por un lado en esta etapa todavía se está produciendo elastogénesis en roedores (Davis 1995). Por otra parte, se ha demostrado que la desnutrición fetal produce elevación en la expresión de MMP-2 y MMP-9 en la edad perinatal (Khorram et al. 2007). Ambas enzimas son elastolíticas; la MMP-2 parece ser constitutiva del tejido vascular y la MMP-9 puede activarse en situaciones de remodelado (Bayer et al. 1999).

En la edad adulta sólo los machos sometidos a restricción nutricional desarrollan hipertensión, por lo que se determinó si existían diferencias entre machos y hembras en las propiedades mecánicas de la aorta, que pudieran contribuir a este dimorfismo sexual.

Se observó que la capacidad de deformación ante una tensión radial era menor en machos R; mientras que en las hembras no se producía dicha alteración. A esta edad ambos, machos y hembras presentan una elevación de la cantidad de colágeno total en la pared vascular. Sin embargo, la distribución del colágeno en la adventicia es diferente; mientras que los machos R presentan una elevación de la cantidad relativa del colágeno en las capas más externas de la túnica adventicia, las hembras R no tienen diferencias con su control. Las fibras de colágeno de la parte más externa de la aorta a tensión sub-máxima aparecen más rectas en comparación con las que se observan en capas más profundas de la adventicia, que están más onduladas. Esto sugiere que es la capa más externa la que más limita la deformabilidad del vaso a elevadas tensiones. Por tanto, la mayor presencia de fibras en la parte externa en

machos R pero no en hembras, podría explicar la mayor rigidez de la aorta, al menos a tensiones elevadas.

Mientras que el colágeno es la proteína responsable de limitar la deformación de los vasos sanguíneos a tensiones elevadas –de ahí la forma exponencial de las curvas tensión-deformación en las arterias (Dobrin 1978, Wagenseil, Mecham 2009)- la elastina es el componente de la pared que condiciona la mecánica vascular a tensiones inferiores (Dobrin 1978, Wagenseil, Mecham 2009). A partir de la edad del destete la elastogénesis prácticamente finaliza y la elastina está sometida mayoritariamente a procesos de remodelado. En ausencia de estímulos hemodinámicos -como elevaciones crónicas de la presión arterial- este remodelado es fisiológico y conlleva un aumento del tamaño de las fenestras a lo largo de la edad (Wong, Langille 1996). Este aumento también fue evidenciado en el presente estudio, como demuestra la disminución del área relativa ocupada por la elastina en la aorta de ratas adultas control en comparación con la de ratas de 21 días. En cuanto a las alteraciones en dicho proceso de remodelado en ratas sometidas a restricción nutricional fetal, se evidenciaron diferencias entre machos y hembras. Así, en los machos R se observó un aumento de la cantidad relativa de elastina, mientras que en hembras se detectó una disminución. La elevación observada en machos puede deberse a la presencia de hipertensión, ya que las CML conservan la capacidad de sintetizar la proteína en respuesta a ciertos estímulos, como por ejemplo la elevación crónica de la presión arterial (Keeley, Alatawi 1991). Sin embargo, esta nueva elastina parece no ser tan efectiva en su papel amortiguador como la producida durante la elastogénesis fisiológica (Arribas et al. 2006). Las diferencias entre sexos también podrían estar asociadas con alteraciones en la expresión de las MMPs. La activación de la MMP-2 está relacionada con el crecimiento de las fenestras en la lámina elástica (Jackson et al. 2002). Las MMPs están reguladas por esteroides sexuales (Vassilev et al. 2005) y se ha demostrado que la programación fetal afecta a los niveles de testosterona (Dasinger, Alexander 2016), por lo que las diferencias de sexo en el crecimiento de las fenestras en la edad adulta también podrían tener un origen hormonal.

Las diferencias en la organización de la lámina elástica de ratas hembra y macho R se traducen en diferencias de comportamiento mecánico de la

elastina purificada, observándose que la menor proporción de elastina frente a fenestras en las hembras se asocia con una mayor elasticidad respecto del control. Este fenómeno ha sido previamente evidenciado en elastina purificada de aorta de ratas SHR, donde la presencia de elastina dentro de las fenestras se asocia con una menor elasticidad (Arribas et al. 2008).

3.2. Alteraciones de las arterias de resistencia

La hipertensión arterial va acompañada de cambios en las arterias de resistencia que producen una reducción del diámetro interno de estos vasos, es decir, un aumento de la resistencia periférica, contribuyendo así al mantenimiento de la presión arterial. Por la importancia de los vasos de resistencia en la regulación de la presión arterial, estudiamos si se producían alteraciones estructurales o mecánicas en dichos vasos que pudieran contribuir a la programación fetal de la hipertensión.

En humanos, los vasos pre-arteriolas de diámetros inferiores a 500 μm se pueden considerar arterias de resistencia, siendo los vasos del lecho mesentérico frecuentemente utilizados en estudios *in vitro* (Mulvany, Aalkjaer 1990). En la rata, clásicamente se ha utilizado la 3ª rama del lecho mesentérico como representativo de arterias de resistencia, por su fácil accesibilidad y por el conocimiento que se tiene de estos vasos y de su remodelado en el animal adulto (Mulvany 2002, Briones et al. 2003).

Los resultados del presente estudio en un modelo de desnutrición fetal llevan a concluir que la alteración estructural de las AMR de las ratas R adultas es un remodelado del tipo eutrófico y hacia dentro (*inward*) ya que observamos una disminución del tamaño la luz arterial y un aumento del grosor de la pared, sin cambios en el área de la sección del vaso. El remodelado es un proceso adaptativo en respuesta a alteraciones en el entorno del vaso como son los factores paracrinós, hormonales y nerviosos, o en respuesta a cambios en las variables hemodinámicas –presión y flujo- (Mulvany 2002). Puesto que en nuestro modelo experimental de programación fetal, solo los machos presentan hipertensión, sugerimos que el remodelado puede ser consecuencia de alteraciones humorales o nerviosas, que no son sexo-dependientes. En todo caso, aunque tanto machos como hembras presentan remodelado, existen algunas diferencias en cuanto a las modificaciones en la cantidad relativa de

células y matriz extracelular. Por un lado se observó que la arteria mesentérica de los machos R presentan una reducción de la densidad de CML, mientras que esto no fue observado en hembras. Esta disminución del contenido celular de la túnica media también se ha evidenciado en arterias mesentéricas de ratas SHR macho adultas (Conde et al. 2011). Sugerimos que la presencia de hipertensión arterial en los machos puede contribuir a las diferencias entre sexos en el remodelado.

La alteración estructural de las AMR está asociada con un aumento de la rigidez intrínseca del vaso, demostrado por el desplazamiento a la izquierda de las curvas tensión-deformación en arterias de ratas R y por el mayor valor del parámetro β . El aumento de la rigidez en la arteria mesentérica de resistencia también ha sido constatado en ratas SHR, habiéndose atribuido a alteraciones en la MEC (Intengan et al. 1999, Briones et al. 2003). En las AMR no se analizó el componente de colágeno, pero es muy probable que se encuentre incrementado en las AMR de ratas R. Esta idea está apoyada por la menor densidad celular observada en la adventicia, lo que sugiere una mayor cantidad de colágeno, que es el componente mayoritario de la MEC en esta capa (Wagenseil, Mecham 2009). Las alteraciones en la adventicia se observaron en ambos sexos, y además, en los machos R también se demostró un menor componente celular en relación a la totalidad de la túnica media. Esto sugiere que también puede existir acumulación de colágeno en la media de estas ratas. Además del colágeno, se ha demostrado que la elastina, a pesar de ser un componente minoritario en arterias de resistencia, juega un papel fundamental en las propiedades mecánicas de estos vasos (González et al. 2005b). El análisis mediante microscopia confocal de fluorescencia de la organización de la lámina elástica interna, demuestra que las fenestras son más pequeñas en las ratas R, tanto machos como hembras. Sugerimos que esto puede contribuir a la menor elasticidad observada en estos vasos, de forma similar a lo descrito en ratas SHR (Briones et al. 2003).

La regulación de la presión arterial depende en gran medida de las arterias de resistencia. Puesto que las AMR de las hembras R de 6 meses de edad presentan remodelado y alteraciones mecánicas, cabría esperar que las ratas desarrollaran hipertensión en etapas posteriores de la vida, al igual que se ha descrito en otros modelos de programación fetal (Ozaki et al. 2001). Sin

embargo, los datos del presente estudio demuestran que las hembras R se mantienen normotensas hasta edades avanzadas. Ello sugiere que las hembras, además de una mejor adaptación de la arteria aorta, presentan otro tipo de ventaja adaptativa adicional, posiblemente relacionada con la función vascular.

Aunque el presente trabajo no evalúa los aspectos funcionales que pudieran estar asociados a la programación fetal de la hipertensión y su dependencia del sexo, sugerimos que parte de las diferencias entre sexos están mediadas por modificaciones en la función endotelial y el estrés oxidativo. Por un lado tenemos evidencia en este modelo experimental de que, al destete los machos R presentan una reducción generalizada de antioxidantes en el plasma y un aumento de daño oxidativo a proteínas, mientras que las hembras tienen una capacidad antioxidante normal y no presentan signos de daño oxidativo (Rodríguez-Rodríguez et al. 2015). Por otro lado, estudios en otros modelos de programación fetal han demostrado disfunción endotelial en las ratas descendientes macho relacionada con una mayor producción de ROS y alteraciones de la NADPH oxidasa (do Carmo Pinho Franco et al. 2003, P Gray, AM Jandeleit-Dahm 2015).

Conclusiones

Conclusions

Conclusiones

Conclusiones relativas a la metodología

1. Se ha optimizado el protocolo para la obtención simultánea de colágeno y elastina de la aorta en ratas de diferentes edades, que permite la cuantificación de ambas proteínas y la realización de estudios funcionales con la elastina purificada.
2. Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal en modo reflexión permiten la visualización y cuantificación del colágeno fibrilar.

Conclusiones relativas a la programación fetal de la hipertensión

La desnutrición fetal provocada por restricción global de la ingesta materna durante la segunda mitad de la gestación induce:

1. Un bajo peso al nacer, que se normaliza al destete por aceleración del crecimiento durante la lactancia y una menor talla que permanece hasta la edad adulta, sin diferencia entre sexos.
2. Desarrollo de hipertensión en los machos a partir de la edad adulta, manteniéndose normotensas las hembras a lo largo de todo el ciclo vital.
3. Un remodelado temprano de la aorta, de tipo hipertrófico hacia el exterior, en ambos sexos. Este remodelado se mantiene en la edad adulta, progresando en las hembras hacia un mayor tamaño de la luz vascular.
4. Una mayor elasticidad de la aorta a edades tempranas en ambos sexos, que evoluciona en la edad adulta hacia una mayor rigidez sólo en los machos, a consecuencia de un mayor contenido de colágeno fibrilar de la adventicia.
5. Una mayor elasticidad intrínseca de la elastina purificada a edades tempranas, que en las hembras se mantiene en la edad adulta y que está asociada con cambios en su organización en la lámina elástica.
6. Un remodelado de la arteria mesentérica de resistencia, de tipo eutrófico hacia el interior, en la edad adulta en ambos sexos.

7. Una menor elasticidad de la arteria mesentérica de resistencia, en ratas adultas de ambos sexos, asociada con una alteración en la organización de la lámina elástica interna.

Conclusiones generales

La inadecuada nutrición durante la vida fetal produce alteraciones estructurales y mecánicas tanto de los vasos de conducción como de los de resistencia que afectan a ambos sexos, desarrollando hipertensión sólo los machos.

Las diferencias entre machos y hembras en el remodelado y el comportamiento mecánico de la aorta pueden contribuir al dimorfismo sexual de la programación fetal de la hipertensión.

Las similitudes entre sexos en las alteraciones de las arterias de resistencia sugieren la existencia de algún mecanismo funcional que evita un aumento de la resistencia periférica en las hembras, que las protege frente al desarrollo de hipertensión.

Conclusions

Conclusions regarding methodological aspects

1. A protocol for simultaneous extraction of collagen and elastin has been optimized in the aorta of rats at different age points, which allows to quantify both proteins and for functional studies with the purified elastin.
2. The images obtained by confocal microscopy in reflection mode allow visualization and quantification of fibrillar collagen.

Conclusions concerning fetal programming of hypertension

Fetal undernutrition, caused by global restriction of maternal intake during the second half of pregnancy, induces:

1. A low birth weight, which is normalized by weaning through growth accelerating during lactation, and a smaller length that remains until adulthood, with no sex differences.
2. Development of hypertension in males from adulthood, remaining normotensive females throughout the entire life span.
3. Early remodeling of the aorta, characterized as hypertrophic outward, in both sexes. Remodeling is also present in adulthood, but in females it progresses towards a greater vascular lumen.
4. Increased elasticity of the aorta at an early age in both sexes, which in adult males develops into a larger stiffness due to a higher content of adventitial fibrillar collagen.
5. A higher intrinsic elasticity of purified elastin at an early age in both sexes, which remains high in females in adulthood and is associated with changes in the organization of the elastic laminae.
6. Remodeling of mesenteric resistance arteries, characterized as eutrophic inward, in adult rats from both sexes.
7. A lower elasticity of the mesenteric resistance artery in adult rats from both sexes, associated with an alteration in the organization of the internal elastic lamina.

General conclusions

Inadequate nutrition during fetal life produces structural and mechanical alterations of conduit and resistance vessels that affect both sexes, while only males develop hypertension.

The differences between males and females in the remodeling and mechanical behavior of the aorta may contribute to the sexual dimorphism of fetal programming of hypertension.

The similarities between the sexes in the alterations of resistance arteries suggest the existence of a functional mechanism that prevents an increase in peripheral resistance in females, which protects them against the development of hypertension.

Bibliografía

AL-GHAZALI, WIDAD, et al. Evidence of Redistribution of Cardiac Output in Asymmetrical Growth Retardation. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 1989, vol. 96, no. 6, pp. 697-704.

ALENTA, H. Pardell; GARCÍA, P. Armarioand DEL REY, R. Hernández. Tabaco, Presión Arterial Y Riesgo Cardiovascular. *Hipertensión Y Riesgo Vascular*, 2003, vol. 20, no. 5, pp. 226-233.

ANDROULAKIS, Emmanuel, et al. The Role of Matrix Metalloproteinases in Essential Hypertension. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2012, vol. 12, no. 10, pp. 1149-1158.

ANGUS, James A.; and WRIGHT, Christine E. Techniques to Study the Pharmacodynamics of Isolated Large and Small Blood Vessels. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 2000, vol. 44, no. 2, pp. 395-407.

ARRIBAS, Silvia M.; HINEK, Aleksanderand GONZÁLEZ, M. Carmen. Elastic Fibres and Vascular Structure in Hypertension. *Pharmacology & Therapeutics*, 2006, vol. 111, no. 3, pp. 771-791.

ARRIBAS, S. M., et al. Heightened Aberrant Deposition of Hard-Wearing Elastin in Conduit Arteries of Prehypertensive SHR is Associated with Increased Stiffness and Inward Remodeling. *American Journal of Physiology.Heart and Circulatory Physiology*, 20081010, Dec, 2008, vol. 295, no. 6, pp. H2299-307. ISSN 0363-6135; 0363-6135.

ARRIBAS, S. M., et al. Cellular Aspects of Vascular Remodeling in Hypertension Revealed by Confocal Microscopy. *Hypertension*, Dec, 1997, vol. 30, no. 6, pp. 1455-1464. ISSN 0194-911X; 0194-911X.

BANEGAS, José R., et al. Epidemiología De Las Enfermedades Cardiovasculares En España. *Revista Española De Cardiología Suplementos*, 2006, vol. 6, no. 7, pp. 3G-12G.

BARKER, David JP, et al. Weight in Infancy and Death from Ischaemic Heart Disease. *The Lancet*, 1989, vol. 334, no. 8663, pp. 577-580.

BARKER, David JP; and OSMOND, Clive. Infant Mortality, Childhood Nutrition, and Ischaemic Heart Disease in England and Wales. *The Lancet*, 1986, vol. 327, no. 8489, pp. 1077-1081.

BAYER, I. M.; ADAMSON, S. L.and LANGILLE, B. L. Atrophic Remodeling of the Artery-Cuffed Artery. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, Jun, 1999, vol. 19, no. 6, pp. 1499-1505. ISSN 1079-5642; 1079-5642.

BEKEDAM, Dick J., et al. Male Predominance in Fetal Distress during Labor. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2002, vol. 187, no. 6, pp. 1605-1607.

BERRY, C. L.; and LOOKER, T. An Alteration in the Chemical Structure of the Aortic Wall Induced by a Finite Period of Growth Inhibition. *Journal of Anatomy*, Jan, 1973, vol. 114, no. Pt 1, pp. 83-94. ISSN 0021-8782; 0021-8782.

BOGDARINA, I., et al. Epigenetic Modification of the Renin-Angiotensin System in the Fetal Programming of Hypertension. *Circulation Research*, 20070125, Mar 2, 2007, vol. 100, no. 4, pp. 520-526. ISSN 1524-4571; 0009-7330.

BRACERO, LA; CASSIDY, S.and BYRNE, DW. Effect of Gender on Perinatal Outcome in Pregnancies Complicated by Diabetes. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 1996, vol. 41, no. 1, pp. 10-14.

BRADFORD, Marion M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, vol. 72, no. 1-2, pp. 248-254.

BRAWLEY, Lee, et al. Dietary Protein Restriction in Pregnancy Induces Hypertension and Vascular Defects in Rat Male Offspring. *Pediatric Research*, 2003, vol. 54, no. 1, pp. 83-90.

BRENNER, Barry M.; and CHERTOW, Glenn M. Congenital Oligonephropathy and the Etiology of Adult Hypertension and Progressive Renal Injury. *American Journal of Kidney Diseases*, 1994, vol. 23, no. 2, pp. 171-175.

BRENNER, B. M.; GARCIA, D. L.and ANDERSON, S. Glomeruli and Blood Pressure. Less of One, More the Other?. *American Journal of Hypertension*, Oct, 1988, vol. 1, no. 4 Pt 1, pp. 335-347. ISSN 0895-7061; 0895-7061.

BRIGHTMAN, AO, et al. Time-lapse Confocal Reflection Microscopy of Collagen Fibrillogenesis and Extracellular Matrix Assembly in Vitro. *Biopolymers*, 2000, vol. 54, no. 3, pp. 222-234.

BRIONES, Ana M., et al. Role of Elastin in Spontaneously Hypertensive Rat Small Mesenteric Artery Remodelling. *The Journal of Physiology*, 2003, vol. 552, no. 1, pp. 185-195.

CAMERON, Noel; and DEMERATH, Ellen W. Critical Periods in Human Growth and their Relationship to Diseases of Aging. *American Journal of Physical Anthropology*, 2002, vol. 119, no. S35, pp. 159-184.

CARLSON, Edward C.; BURROWS, Mary E.and JOHNSON, Paul C. Electron Microscopic Studies of Cat Mesenteric Arterioles: A Structure-Function Analysis. *Microvascular Research*, 1982, vol. 24, no. 2, pp. 123-141.

CELERMAJER, David S., et al. Aging is Associated with Endothelial Dysfunction in Healthy Men Years before the Age-Related Decline in Women. *Journal of the American College of Cardiology*, 1994, vol. 24, no. 2, pp. 471-476.

CHAN, Doris T., et al. Dyslipidaemia and Cardiorenal Disease: Mechanisms, Therapeutic Opportunities and Clinical Trials. *Atherosclerosis*, 2008, vol. 196, no. 2, pp. 823-834.

CHAPLEAU, Mark W.; HAJDUCZOK, Georgeand ABOUD, Francois M. Mechanisms of Resetting of Arterial Baroreceptors: An Overview. *The American Journal of the Medical Sciences*, 1988, vol. 295, no. 4, pp. 327-334.

CHEN, W., et al. Low Birth Weight is Associated with Higher Blood Pressure Variability from Childhood to Young Adulthood: The Bogalusa Heart Study. *American Journal of Epidemiology*, Oct 1, 2012, vol. 176 Suppl 7, pp. S99-105. ISSN 1476-6256; 0002-9262.

CHEUNG, Y. F., et al. Relation of Arterial Stiffness with Gestational Age and Birth Weight. *Archives of Disease in Childhood*, Mar, 2004, vol. 89, no. 3, pp. 217-221. ISSN 1468-2044; 0003-9888.

CICCHI, Riccardo, et al. From Molecular Structure to Tissue Architecture: Collagen Organization Probed by SHG Microscopy. *Journal of Biophotonics*, 2013, vol. 6, no. 2, pp. 129-142.

COATS, P., et al. The use of Fluorescent Nuclear Dyes and Laser Scanning Confocal Microscopy to Study the Cellular Aspects of Arterial Remodelling in Human Subjects with Critical Limb Ischaemia. *Experimental Physiology*, 2003, vol. 88, no. 4, pp. 547-554.

CONDE, M. V., et al. Liver Growth Factor Treatment Restores Cell-Extracellular Matrix Balance in Resistance Arteries and Improves Left Ventricular Hypertrophy in SHR. *American Journal of Physiology.Heart and Circulatory Physiology*, 20110603, Sep, 2011, vol. 301, no. 3, pp. H1153-65. ISSN 1522-1539; 0363-6135.

DAAMEN, WF, et al. Comparison of Five Procedures for the Purification of Insoluble Elastin. *Biomaterials*, 2001, vol. 22, no. 14, pp. 1997-2005.

DASINGER, J. H.; and ALEXANDER, B. T. Gender Differences in Developmental Programming of Cardiovascular Diseases. *Clinical Science (London, England : 1979)*, Mar, 2016, vol. 130, no. 5, pp. 337-348. ISSN 1470-8736; 0143-5221.

DAVIS, E. C. Elastic Lamina Growth in the Developing Mouse Aorta. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, Nov, 1995, vol. 43, no. 11, pp. 1115-1123. ISSN 0022-1554; 0022-1554.

DE LA SIERRA, Alejandro, et al. Evaluación Y Tratamiento De La Hipertensión Arterial En España. Documento De Consenso. *Medicina Clínica*, 2008, vol. 131, no. 3, pp. 104-116.

DENK, Winfried; PISTON, David W. and WEBB, Watt W. Handbook of biological confocal microscopy Springer, 1995. *Two-Photon Molecular Excitation in Laser-Scanning Microscopy*, pp. 445-458.

DI RENZO, Gian Carlo, et al. Does Fetal Sex Affect Pregnancy Outcome?. *Gender Medicine*, 2007, vol. 4, no. 1, pp. 19-30.

DIBONA, GF; and KOPP, UC. Neural Control of Renal Function: Role in Human Hypertension. *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management. 2nd Edition.* Laragh JH, Brenner BM, Eds. New York: Raven Pr, 1995, pp. 1349-1358.

DO CARMO PINHO FRANCO, M., et al. Intrauterine Undernutrition--Renal and Vascular Origin of Hypertension. *Cardiovascular Research*, Nov 1, 2003, vol. 60, no. 2, pp. 228-234. ISSN 0008-6363; 0008-6363.

DOBRIN, P. B. Mechanical Properties of Arteries. *Physiological Reviews*, Apr, 1978, vol. 58, no. 2, pp. 397-460. ISSN 0031-9333; 0031-9333.

DORMANDY, John A.; and MURRAY, Gordon D. The Fate of the Claudicant—a Prospective Study of 1969 Claudicants. *European Journal of Vascular Surgery*, 1991, vol. 5, no. 2, pp. 131-133.

DREXLER, Helmut. Endothelial Dysfunction: Clinical Implications. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 1997, vol. 39, no. 4, pp. 287-324.

EBLE, Johannes A.; and NILAND, Stephan. The Extracellular Matrix of Blood Vessels. *Current Pharmaceutical Design*, 2009, vol. 15, no. 12, pp. 1385-1400.

EDWARDS, Lisa J.; and MCMILLEN, Isabella Caroline. Maternal Undernutrition Increases Arterial Blood Pressure in the Sheep Fetus during Late Gestation. *The Journal of Physiology*, 2001, vol. 533, no. 2, pp. 561-570.

EPSTEIN, Murray. Aldosterone and the Hypertensive Kidney: Its Emerging Role as a Mediator of Progressive Renal Dysfunction: A Paradigm Shift. *Journal of Hypertension*, 2001, vol. 19, no. 5, pp. 829-842.

ERIKSSON, Johan G., et al. Boys Live Dangerously in the Womb. *American Journal of Human Biology*, 2010, vol. 22, no. 3, pp. 330-335.

ESTELLER PÉREZ, A. Biología De La Pared Vascular Y Síndrome Metabólico. *Nutrición Hospitalaria*, 2005, vol. 20, no. 1, pp. 5-17.

FAURY, Gilles. Function–structure Relationship of Elastic Arteries in Evolution: From Microfibrils to Elastin and Elastic Fibres. *Pathologie Biologie*, 2001, vol. 49, no. 4, pp. 310-325.

FERNANDEZ VALENZUELA, V., et al. Embolisms of the Arm. *Angiologia*, May-Jun, 1988, vol. 40, no. 3, pp. 93-99. ISSN 0003-3170; 0003-3170.

FISCHER, EDMUNDO I. CABRERA; and CABRERA, I. Biomecánica De La Hipertensión Arterial. *Rev Argent Cardiol*, 2004, vol. 72, pp. 150-156.

FRANCO, Maria CP, et al. Long-Term Effects of Intrauterine Malnutrition on Vascular Function in Female Offspring: Implications of Oxidative Stress. *Life Sciences*, 2007, vol. 80, no. 8, pp. 709-715.

FRIEDMAN, WF; and CHILD, JS. Harrison. Principios de medicina interna. IMcGraw-Hill-interamericana Madrid, 1998. *Cardiopatías Congénitas En El Adulto*, pp. 1486-1496.

GELSE, Kolja; PÖSCHL, E.and AIGNER, T. Collagens—structure, Function, and Biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2003, vol. 55, no. 12, pp. 1531-1546.

GICQUEL, Christine; EL-OSTA, Assamand LE BOUC, Yves. Epigenetic Regulation and Fetal Programming. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2008, vol. 22, no. 1, pp. 1-16.

GILBERT, Jeffrey S., et al. Maternal Nutrient Restriction in Sheep: Hypertension and Decreased Nephron Number in Offspring at 9 Months of Age. *The Journal of Physiology*, 2005, vol. 565, no. 1, pp. 137-147.

GIMBRONE, M. A., Jr; and GARCIA-CARDENA, G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circulation Research*, Feb 19, 2016, vol. 118, no. 4, pp. 620-636. ISSN 1524-4571; 0009-7330.

GONZÁLEZ, José M., et al. Influence of Elastin on Rat Small Artery Mechanical Properties. *Experimental Physiology*, 2005a, vol. 90, no. 4, pp. 463-468.

GONZALEZ, M. C., et al. Effect of Removal of Adventitia on Vascular Smooth Muscle Contraction and Relaxation. *American Journal of Physiology.Heart and Circulatory Physiology*, Jun, 2001, vol. 280, no. 6, pp. H2876-81. ISSN 0363-6135; 0363-6135.

GU, K.; COWIE, C. C.and HARRIS, M. I. Mortality in Adults with and without Diabetes in a National Cohort of the U.S. Population, 1971-1993. *Diabetes Care*, Jul, 1998, vol. 21, no. 7, pp. 1138-1145. ISSN 0149-5992; 0149-5992.

GUALLAR-CASTILLÓN, Pilar, et al. Magnitud Y Manejo De La Hipercolesterolemia En La Población Adulta De España, 2008-2010: El Estudio ENRICA. *Revista Española De Cardiología*, 2012, vol. 65, no. 6, pp. 551-558.

HEENEMAN, S.; SLUIMER, J. C.and DAEMEN, M. J. Angiotensin-Converting Enzyme and Vascular Remodeling. *Circulation Research*, Aug 31, 2007, vol. 101, no. 5, pp. 441-454. ISSN 1524-4571; 0009-7330.

HEIJMANS, Bastiaan T., et al. Persistent Epigenetic Differences Associated with Prenatal Exposure to Famine in Humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, vol. 105, no. 44, pp. 17046-17049.

HEMMELGARN, B. R., et al. The 2004 Canadian Hypertension Education Program Recommendations for the Management of Hypertension: Part I--Blood Pressure Measurement, Diagnosis and Assessment of Risk. *The Canadian Journal of Cardiology*, Jan, 2004, vol. 20, no. 1, pp. 31-40. ISSN 0828-282X; 0828-282X.

HUGHSON, Michael, et al. Glomerular Number and Size in Autopsy Kidneys: The Relationship to Birth Weight. *Kidney International*, 2003, vol. 63, no. 6, pp. 2113-2122.

HULT, Martin, et al. Hypertension, Diabetes and Overweight: Looming Legacies of the Biafran Famine. *PLoS One*, 2010, vol. 5, no. 10, pp. e13582.

INOUE, Shinya. Handbook of biological confocal microscopySpringer, 2006. *Foundations of Confocal Scanned Imaging in Light Microscopy*, pp. 1-19.

INTAPAD, S., et al. Sex Differences in the Developmental Origins of Cardiovascular Disease. *Physiology (Bethesda, Md.)*, Mar, 2014, vol. 29, no. 2, pp. 122-132. ISSN 1548-9221; 1548-9221.

INTENGAN, H. D.; and SCHIFFRIN, E. L. Structure and Mechanical Properties of Resistance Arteries in Hypertension: Role of Adhesion Molecules and Extracellular Matrix Determinants. *Hypertension*, Sep, 2000, vol. 36, no. 3, pp. 312-318. ISSN 1524-4563; 0194-911X.

INTENGAN, H. D., et al. Resistance Artery Mechanics, Structure, and Extracellular Components in Spontaneously Hypertensive Rats : Effects of Angiotensin Receptor Antagonism and Converting Enzyme Inhibition. *Circulation*, Nov 30, 1999, vol. 100, no. 22, pp. 2267-2275. ISSN 1524-4539; 0009-7322.

IRVING, R. John, et al. Adult Cardiovascular Risk Factors in Premature Babies. *The Lancet*, 2000, vol. 355, no. 9221, pp. 2135-2136.

JACKSON, Z. S.; GOTLIEB, A. I.and LANGILLE, B. L. Wall Tissue Remodeling Regulates Longitudinal Tension in Arteries. *Circulation Research*, May 3, 2002, vol. 90, no. 8, pp. 918-925. ISSN 1524-4571; 0009-7330.

JACOB, Marie Paule. Extracellular Matrix Remodeling and Matrix Metalloproteinases in the Vascular Wall during Aging and in Pathological Conditions. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2003, vol. 57, no. 5, pp. 195-202.

JAENISCH, Rudolf; and BIRD, Adrian. Epigenetic Regulation of Gene Expression: How the Genome Integrates Intrinsic and Environmental Signals. *Nature Genetics*, 2003, vol. 33, pp. 245-254.

KEELEY, F. W.; and ALATAWI, A. Response of Aortic Elastin Synthesis and Accumulation to Developing Hypertension and the Inhibitory Effect of Colchicine on this Response. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, Apr, 1991, vol. 64, no. 4, pp. 499-507. ISSN 0023-6837; 0023-6837.

KHORRAM, O., et al. Nutrient Restriction in Utero Induces Remodeling of the Vascular Extracellular Matrix in Rat Offspring. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, Jan, 2007, vol. 14, no. 1, pp. 73-80. ISSN 1933-7205; 1933-7191.

KIELTY, C. M.; SHERRATT, M. J. and SHUTTLEWORTH, C. A. Elastic Fibres. *Journal of Cell Science*, Jul 15, 2002, vol. 115, no. Pt 14, pp. 2817-2828. ISSN 0021-9533; 0021-9533.

KRISHNAMACHARI, K. A.; and IYENGAR, L. Effect of Maternal Malnutrition on the Bone Density of the Neonates. *The American Journal of Clinical Nutrition*, May, 1975, vol. 28, no. 5, pp. 482-486. ISSN 0002-9165; 0002-9165.

KUSCHNIR, Maria CC; and MENDONÇA, Gulnar AS. Fatores De Risco Associados À Hipertensão Arterial Em Adolescentes. *Jornal De Pediatria*, 2007, vol. 83, no. 4, pp. 335-342.

LANDSBERG, Lewis. Insulin-Mediated Sympathetic Stimulation: Role in the Pathogenesis of Obesity-Related Hypertension (Or, how Insulin Affects Blood Pressure, and Why). *Journal of Hypertension*, 2001, vol. 19, no. 3, pp. 523-528.

LANGILLE, BL. Hemodynamic Factors and Vascular Disease. *Cardiovascular Pathology*, 1991, pp. 131-154.

LASCHKOLNIG, A., et al. Lipoprotein (a) Concentrations, Apolipoprotein (a) Phenotypes, and Peripheral Arterial Disease in Three Independent Cohorts. *Cardiovascular Research*, 20140422, Jul 1, 2014, vol. 103, no. 1, pp. 28-36. ISSN 1755-3245; 0008-6363.

LEESON, C. P., et al. Flow-Mediated Dilation in 9- to 11-Year-Old Children: The Influence of Intrauterine and Childhood Factors. *Circulation*, Oct 7, 1997, vol. 96, no. 7, pp. 2233-2238. ISSN 0009-7322; 0009-7322.

LEMARIÉ, Catherine A.; THARAUX, Pierre-Louis and LEHOUX, Stéphanie. Extracellular Matrix Alterations in Hypertensive Vascular Remodeling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2010, vol. 48, no. 3, pp. 433-439.

LIAO, Duanping, et al. Arterial Stiffness and the Development of Hypertension. *Hypertension*, 1999, vol. 34, no. 2, pp. 201-206.

LIBBY, Peter. Prevención Y Tratamiento De La Aterosclerosis. *Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Larry Jameson J, Editores. Harrison: Principios De Medicina Interna. 15ª ed. Madrid: McGrawHill-Interamericana De España*, 2002, pp. 1624-1628.

LLACER, A.; and FERNÁNDEZ-CUENCA, R. Mortalidad En España En 1999 Y 2000 (II). *Bol Epidemiol Semanal*, 2003, vol. 11, pp. 121-132.

LÖVESTAM-ADRIAN, Monica; AGARDH, Elisabet and AGARDH, Carl-David. The Incidence of Nephropathy in Type 1 Diabetic Patients with Proliferative

Retinopathy: A 10-Year Follow-Up Study. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 1998, vol. 39, no. 1, pp. 11-17.

LUO, ZC, et al. Tracing the Origins of “fetal Origins” of Adult Diseases: Programming by Oxidative Stress?. *Medical Hypotheses*, 2006, vol. 66, no. 1, pp. 38-44.

MACKENZIE, Harald S.; LAWLER, Elizabeth V. and BRENNER, Barry M. Congenital Oligonephropathy: The Fetal Flaw in Essential Hypertension?. *Kidney International Supplement*, 1996, no. 55.

MANALICH, Reinaldo, et al. Relationship between Weight at Birth and the Number and Size of Renal Glomeruli in Humans: A Histomorphometric Study. *Kidney International*, 2000, vol. 58, no. 2, pp. 770-773.

MARK, A. L. The Sympathetic Nervous System in Hypertension: A Potential Long-Term Regulator of Arterial Pressure. *Journal of Hypertension. Supplement : Official Journal of the International Society of Hypertension*, Dec, 1996, vol. 14, no. 5, pp. S159-65. ISSN 0952-1178; 0952-1178.

MARTYN, CN; and GREENWALD, SE. A Hypothesis about a Mechanism for the Programming of Blood Pressure and Vascular Disease in Early Life. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2001, vol. 28, no. 11, pp. 948-951.

MARTYN, CN; and GREENWALD, SE. Impaired Synthesis of Elastin in Walls of Aorta and Large Conduit Arteries during Early Development as an Initiating Event in Pathogenesis of Systemic Hypertension. *The Lancet*, 1997a, vol. 350, no. 9082, pp. 953-955.

MARTYN, C. N., et al. Growth in Utero, Adult Blood Pressure, and Arterial Compliance. *British Heart Journal*, Feb, 1995, vol. 73, no. 2, pp. 116-121. ISSN 0007-0769; 0007-0769.

MATHIASSEN, O. N., et al. Small Artery Structure is an Independent Predictor of Cardiovascular Events in Essential Hypertension. *Journal of Hypertension*, May, 2007, vol. 25, no. 5, pp. 1021-1026. ISSN 0263-6352; 0263-6352.

MCENIERY, Carmel M.; WILKINSON, Ian B. and AVOLIO, Albert P. Age, Hypertension and Arterial Function. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2007, vol. 34, no. 7, pp. 665-671.

MCMILLEN, I. C.; and ROBINSON, J. S. Developmental Origins of the Metabolic Syndrome: Prediction, Plasticity, and Programming. *Physiological Reviews*, Apr, 2005, vol. 85, no. 2, pp. 571-633. ISSN 0031-9333; 0031-9333.

MECHAM, Robert P., et al. Elastic fibre Assembly: Macromolecular Interactions. *The Molecular Biology and Pathology of Elastic Tissues*, 2008, vol. 773, pp. 172-184.

MEDRANO, M. José, et al. Factores De Riesgo Cardiovascular En La Población Española: Metaanálisis De Estudios Transversales. *Medicina Clínica*, 2005, vol. 124, no. 16, pp. 606-612.

MICHIELS, Carine. Endothelial Cell Functions. *Journal of Cellular Physiology*, 2003, vol. 196, no. 3, pp. 430-443.

MILAN, Alberto, et al. Arterial Stiffness. *High Blood Pressure & Cardiovascular Prevention*, 2011, vol. 18, no. 1, pp. 1-12.

MIRÓ MEDA, JM, et al. Endocarditis Infecciosa. Rozman C, Cardellach F. *Farreras-Rozman. Medicina Interna*, 2012, vol. 17.

MOHANKUMAR, Sheba MJ, et al. Developmental Programming of Cardiovascular Disorders: Focus on Hypertension. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 2007, vol. 8, no. 2, pp. 115-125.

MONTGOMERY, Alan A., et al. Birth Size and Arterial Compliance in Young Adults. *The Lancet*, 2000, vol. 355, no. 9221, pp. 2136-2137.

MULVANY, M. J. Small Artery Remodeling and Significance in the Development of Hypertension. *News in Physiological Sciences : An International Journal of Physiology Produced Jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society*, Jun, 2002, vol. 17, pp. 105-109. ISSN 0886-1714; 0886-1714.

MULVANY, M. J.; and AALKJAER, C. Structure and Function of Small Arteries. *Physiological Reviews*, Oct, 1990, vol. 70, no. 4, pp. 921-961. ISSN 0031-9333; 0031-9333.

MULVANY, M. J., et al. Vascular Remodeling. *Hypertension*, Sep, 1996, vol. 28, no. 3, pp. 505-506. ISSN 0194-911X; 0194-911X.

MUNOZ-VALVERDE, D., et al. Effect of Fetal Undernutrition and Postnatal Overfeeding on Rat Adipose Tissue and Organ Growth at Early Stages of Postnatal Development. *Physiological Research*, 2015, vol. 64, no. 4, pp. 547.

NAVARRO, Jorge, et al. Metabolic Syndrome, Organ Damage and Cardiovascular Disease in Treated Hypertensive Patients. the ERIC-HTA Study. *Blood Pressure*, 2007, vol. 16, no. 1, pp. 20-27.

NUYT, A. M. Mechanisms Underlying Developmental Programming of Elevated Blood Pressure and Vascular Dysfunction: Evidence from Human Studies and Experimental Animal Models. *Clinical Science (London, England : 1979)*, Jan, 2008, vol. 114, no. 1, pp. 1-17. ISSN 1470-8736; 0143-5221.

O'CONNELL, Mary K., et al. The Three-Dimensional Micro-and Nanostructure of the Aortic Medial Lamellar Unit Measured using 3D Confocal and Electron Microscopy Imaging. *Matrix Biology*, 2008, vol. 27, no. 3, pp. 171-181.

OJEDA, N. B., et al. Estrogen Protects Against Increased Blood Pressure in Postpubertal Female Growth Restricted Offspring. *Hypertension*, 20070827, Oct, 2007a, vol. 50, no. 4, pp. 679-685. ISSN 1524-4563; 0194-911X.

OJEDA, N. B., et al. Testosterone Contributes to Marked Elevations in Mean Arterial Pressure in Adult Male Intrauterine Growth Restricted Offspring. *American Journal of Physiology.Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 20060817, Feb, 2007b, vol. 292, no. 2, pp. R758-63. ISSN 0363-6119; 0363-6119.

OJEDA, N. B., et al. Oxidative Stress Contributes to Sex Differences in Blood Pressure in Adult Growth-Restricted Offspring. *Hypertension*, 20120514, Jul, 2012, vol. 60, no. 1, pp. 114-122. ISSN 1524-4563; 0194-911X.

OPARIL, Suzanne; ZAMAN, M. Aminand CALHOUN, David A. Pathogenesis of Hypertension. *Annals of Internal Medicine*, 2003, vol. 139, no. 9, pp. 761-776.

OREN, A., et al. Gestational Age and Birth Weight in Relation to Aortic Stiffness in Healthy Young Adults: Two Separate Mechanisms?. *American Journal of Hypertension*, Jan, 2003, vol. 16, no. 1, pp. 76-79. ISSN 0895-7061; 0895-7061.

OZAKI, T., et al. Dietary Restriction in Pregnant Rats Causes Gender-related Hypertension and Vascular Dysfunction in Offspring. *The Journal of Physiology*, 2001, vol. 530, no. 1, pp. 141-152.

P GRAY, Stephen; and AM JANDELEIT-DAHM, Karin. The Role of NADPH Oxidase in Vascular Disease—hypertension, Atherosclerosis & Stroke. *Current Pharmaceutical Design*, 2015, vol. 21, no. 41, pp. 5933-5944.

PAINTER, Rebecca C.; ROSEBOOM, Tessa J.and BLEKER, Otto P. Prenatal Exposure to the Dutch Famine and Disease in Later Life: An Overview. *Reproductive Toxicology*, 2005, vol. 20, no. 3, pp. 345-352.

PARAMO, JA, et al. Metaloproteasas En Aterosclerosis: Implicaciones Fisiopatológicas Y Terapéuticas. *Clínica E Investigación En Arteriosclerosis*, 2005, vol. 17, no. 3, pp. 133-141.

PEDRO-BOTET, J., et al. Apolipoprotein (a) Genetic Polymorphism and Serum Lipoprotein (a) Concentration in Patients with Peripheral Vascular Disease. *Atherosclerosis*, 1993, vol. 104, no. 1, pp. 87-94.

PEREIRA, Thiago MC, et al. Cardiac and Vascular Changes in Elderly Atherosclerotic Mice: The Influence of Gender. *Lipids in Health and Disease*, 2010, vol. 9, no. 1, pp. 1.

PEUGNET, Pauline, et al. Management of the Pregnant Mare and Long-Term Consequences on the Offspring. *Theriogenology*, 2016, vol. 86, no. 1, pp. 99-109.

PIERDOMINICI, Marina, et al. Gender Specific Aspects of Cell Death in the Cardiovascular System. *Current Pharmaceutical Design*, 2011, vol. 17, no. 11, pp. 1046-1055.

PONTICOS, Markella; and SMITH, Barbara D. Extracellular Matrix Synthesis in Vascular Disease: Hypertension, and Atherosclerosis. *J Biomed Res*, 2014, vol. 28, no. 1, pp. 25-39.

POSTON, Lucilla. Influence of Maternal Nutritional Status on Vascular Function in the Offspring. *Microcirculation*, 2011a, vol. 18, no. 4, pp. 256-262.

POURAGEAUD, F.; and DE MEY, J. G. Structural Properties of Rat Mesenteric Small Arteries After 4-Wk Exposure to Elevated Or Reduced Blood Flow. *The American Journal of Physiology*, Oct, 1997, vol. 273, no. 4 Pt 2, pp. H1699-706. ISSN 0002-9513; 0002-9513.

PUZYREV, VP. Genetic Bases of Human Comorbidity. *Russian Journal of Genetics*, 2015, vol. 51, no. 4, pp. 408-417.

RABINOVITCH, M. EVE and Beyond, Retro and Prospective Insights. *The American Journal of Physiology*, Jul, 1999, vol. 277, no. 1 Pt 1, pp. L5-12. ISSN 0002-9513; 0002-9513.

RHODIN, JAG. Handbook of Physiology: The Cardiovascular System. *Architecture of the Vessel Wall*, 1980, pp. 1-31.

RIZZONI, D., et al. Prognostic Significance of Small-Artery Structure in Hypertension. *Circulation*, 20031013, Nov 4, 2003, vol. 108, no. 18, pp. 2230-2235. ISSN 1524-4539; 0009-7322.

ROBERT, Ladislav. Elastin, Past, Present and Future. *Pathologie Biologie*, 2002, vol. 50, no. 8, pp. 503-511.

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, Pilar, et al. A Simple Dot-blot–Sirius Red-Based Assay for Collagen Quantification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2013, vol. 405, no. 21, pp. 6863-6871.

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, Pilar, et al. Fetal Undernutrition is Associated with Perinatal Sex-Dependent Alterations in Oxidative Status. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2015, vol. 26, no. 12, pp. 1650-1659.

ROSEBOOM, T. J., et al. Coronary Heart Disease After Prenatal Exposure to the Dutch Famine, 1944-45. *Heart (British Cardiac Society)*, Dec, 2000, vol. 84, no. 6, pp. 595-598. ISSN 1468-201X; 1355-6037.

ROZARIO, Tania; and DESIMONE, Douglas W. The Extracellular Matrix in Development and Morphogenesis: A Dynamic View. *Developmental Biology*, 2010, vol. 341, no. 1, pp. 126-140.

SAFAR, Michel E.; O'ROURKE, Michael F. and FROHLICH, Edward D. *Blood Pressure and Arterial Wall Mechanics in Cardiovascular Diseases*. Springer, 2014.

SAKAMOTO, Mineshi; NAKANO, Atsuhiko and AKAGI, Hirokatsu. Declining Minamata Male Birth Ratio Associated with Increased Male Fetal Death due to Heavy Methylmercury Pollution. *Environmental Research*, 2001, vol. 87, no. 2, pp. 92-98.

SALVOTELLI, Laura, et al. Prevalence of Neuropathy in Type 2 Diabetic Patients and its Association with Other Diabetes Complications: The Verona Diabetic Foot Screening Program. *Journal of Diabetes and its Complications*, 2015, vol. 29, no. 8, pp. 1066-1070.

SARNAK, M. J., et al. Kidney Disease as a Risk Factor for Development of Cardiovascular Disease: A Statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Circulation*, Oct 28, 2003, vol. 108, no. 17, pp. 2154-2169. ISSN 1524-4539; 0009-7322.

SHERMAN, R. C.; and LANGLEY-EVANS, S. C. Antihypertensive Treatment in Early Postnatal Life Modulates Prenatal Dietary Influences upon Blood Pressure in the Rat. *Clinical Science (London, England : 1979)*, Mar, 2000, vol. 98, no. 3, pp. 269-275. ISSN 0143-5221; 0143-5221.

SINGHAL, A., et al. Promotion of Faster Weight Gain in Infants Born Small for Gestational Age: Is there an Adverse Effect on Later Blood Pressure?. *Circulation*, 20061218, Jan 16, 2007, vol. 115, no. 2, pp. 213-220. ISSN 1524-4539; 0009-7322.

SINHA, Nakshi; and KUMAR DABLA, Pradeep. Oxidative Stress and Antioxidants in Hypertension—A Current Review. *Current Hypertension Reviews*, 2015, vol. 11, no. 2, pp. 132-142.

SKILTON, Michael R., et al. Aortic Wall Thickness in Newborns with Intrauterine Growth Restriction. *The Lancet*, 2005, vol. 365, no. 9469, pp. 1484-1486.

SOWERS, J. R.; EPSTEIN, M. and FROHLICH, E. D. Diabetes, Hypertension, and Cardiovascular Disease: An Update. *Hypertension*, Apr, 2001, vol. 37, no. 4, pp. 1053-1059. ISSN 1524-4563; 0194-911X.

STARK, Michal J.; CLIFTON, Vicki L. and WRIGHT, Ian MR. Sex-Specific Differences in Peripheral Microvascular Blood Flow in Preterm Infants. *Pediatric Research*, 2008, vol. 63, no. 4, pp. 415-419.

STRIPPING, A. Abriendo Paso Para Un Corazón Sano. *Estadod Unidos, Grundy Lane*, 1997, pp. 1-15.

SUMPIO, Bauer E.; RILEY, J. Timothy and DARDIK, Alan. Cells in Focus: Endothelial Cell. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2002, vol. 34, no. 12, pp. 1508-1512.

TARRY-ADKINS, J. L., et al. Poor Maternal Nutrition Followed by Accelerated Postnatal Growth Leads to Alterations in DNA Damage and Repair, Oxidative and Nitrosative Stress, and Oxidative Defense Capacity in Rat Heart. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20120927, Jan, 2013, vol. 27, no. 1, pp. 379-390. ISSN 1530-6860; 0892-6638.

Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension; and European Society of Cardiology. 2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension. *J Hypertens*, 2007, vol. 25, pp. 1105-1187.

THOMPSON, Loren P.; and AL-HASAN, Yazan. Impact of Oxidative Stress in Fetal Programming. *Journal of Pregnancy*, 2012, vol. 2012.

TIMBERLAKE, David S.; O'CONNOR, Daniel T. and PARMER, Robert J. Molecular Genetics of Essential Hypertension: Recent Results and Emerging Strategies. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 2001, vol. 10, no. 1, pp. 71-79.

TOUYZ, Rhian M.; and SCHIFFRIN, Ernesto L. Signal Transduction Mechanisms Mediating the Physiological and Pathophysiological Actions of Angiotensin II in Vascular Smooth Muscle Cells. *Pharmacological Reviews*, 2000, vol. 52, no. 4, pp. 639-672.

TREMBLAY, Mark Stephen, et al. Physiological and Health Implications of a Sedentary Lifestyle. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 2010, vol. 35, no. 6, pp. 725-740.

VAN GORP, A. W., et al. In Spontaneously Hypertensive Rats Alterations in Aortic Wall Properties Precede Development of Hypertension. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, Apr, 2000, vol. 278, no. 4, pp. H1241-7. ISSN 0363-6135; 0363-6135.

VAN VARIK, B. J., et al. Mechanisms of Arterial Remodeling: Lessons from Genetic Diseases. *Frontiers in Genetics*, 20121213, Dec 13, 2012, vol. 3, pp. 290. ISSN 1664-8021; 1664-8021.

VASSILEV, Vassil, et al. Response of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases Messenger Ribonucleic Acids to Ovarian Steroids in Human Endometrial Explants Mimics their Gene-and Phase-Specific Differential Control in Vivo. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2005, vol. 90, no. 10, pp. 5848-5857.

VEHASKARI, V. Matti; AVILES, Diego H. and MANNING, Jennifer. Prenatal Programming of Adult Hypertension in the Rat. *Kidney International*, 2001, vol. 59, no. 1, pp. 238-245.

VEHASKARI, V. M., et al. Kidney Angiotensin and Angiotensin Receptor Expression in Prenatally Programmed Hypertension. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 20040420, Aug, 2004, vol. 287, no. 2, pp. F262-7. ISSN 1931-857X; 1522-1466.

VIRTANEN, K. A., et al. Increased Fat Mass Compensates for Insulin Resistance in Abdominal Obesity and Type 2 Diabetes: A Positron-Emitting Tomography Study. *Diabetes*, Sep, 2005, vol. 54, no. 9, pp. 2720-2726. ISSN 0012-1797; 0012-1797.

WAGENSEIL, J. E.; and MECHAM, R. P. Vascular Extracellular Matrix and Arterial Mechanics. *Physiological Reviews*, Jul, 2009, vol. 89, no. 3, pp. 957-989. ISSN 0031-9333; 0031-9333.

WANG, M.; MONTICONE, R. E. and LAKATTA, E. G. Arterial Aging: A Journey into Subclinical Arterial Disease. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, Mar, 2010, vol. 19, no. 2, pp. 201-207. ISSN 1473-6543; 1062-4821.

WOLINSKY, H.; and GLAGOV, S. A Lamellar Unit of Aortic Medial Structure and Function in Mammals. *Circulation Research*, Jan, 1967, vol. 20, no. 1, pp. 99-111. ISSN 0009-7330; 0009-7330.

WONG, L. C.; and LANGILLE, B. L. Developmental Remodeling of the Internal Elastic Lamina of Rabbit Arteries: Effect of Blood Flow. *Circulation Research*, May, 1996, vol. 78, no. 5, pp. 799-805. ISSN 0009-7330; 0009-7330.

World Health Organization. *Global Health Risks: Mortality and Burden of Disease Attributable to Selected Major Risks*. World Health Organization, 2009.

World Health Organization. *The World Health Report 2002: Reducing Risks, Promoting Healthy Life*. World Health Organization, 2002.

YAMATANI, H.; TAKAHASHI, K. and NAGASE, S. Sex Hormones and Physiological Function. *Nihon Rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine*, Apr, 2015, vol. 73, no. 4, pp. 565-570. ISSN 0047-1852; 0047-1852.

ZEITLIN, Jennifer, et al. Fetal Sex and Indicated very Preterm Birth: Results of the EPIPAGE Study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2004, vol. 190, no. 5, pp. 1322-1325.